



ニワトリ松果体の光周期反応に関する組織学的・生理化学的研究

土井, 守

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

1985-03-31

(Date of Publication)

2009-04-22

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0551

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000551>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士論文

ニワトリ松果体の光周期反応に
関する組織学的・生理化学的研究

神戸大学大学院自然科学研究科

土井 守

目 次

第 I 章	緒 論	1 ~ 4
第 II 章	ニワトリ松果体の形成過程における組織学的変化	
	緒 言	6
	材料と方法	6 ~ 7
	結 果	7 ~ 13
	考 察	14 ~ 18
	要 約	18
第 III 章	ニワトリ松果体の小胞構造とその細胞の特性	
	緒 言	20
	材料と方法	20 ~ 21
	結 果	22 ~ 25
	考 察	25 ~ 26
	要 約	27
第 IV 章	明暗光周期がニワトリ松果体組織に及ぼす影響	
	緒 言	29
	材料と方法	29 ~ 31
	結 果	31 ~ 42
	考 察	42 ~ 46
	要 約	46 ~ 47
第 V 章	ニワトリひな松果体におけるセロトニン <u>N</u> -アセチル ルトランスフェラーゼ活性の光周期変化	
	緒 言	49 ~ 50
	材料と方法	51 ~ 53
	結 果	53 ~ 76
	考 察	76 ~ 80
	要 約	81 ~ 82

第Ⅶ章	總括	83 ~ 85
謝辭		86
文獻		87 ~ 98
写真說明		98 ~ 103
写真		104 ~ 122

第 I 章 緒 論

生物は、この地球上に存在し始めてから、種々の環境変化を受けとめ、長い年月を経てこれら外界の変化に適応するための生理機能を獲得するにいたった。生物をとりまく環境の中で、最も重要かつ規則的な変化の一つは明暗の日周変化であると思われるが、その光周期の変化に対応して、生体の恒常性を保つ必要性から生じたのが、いわゆる“生体時計 (Biological Clock)” であると考えられる。そして、生体時計機構に関与する器官の一つとして松果体 (Pineal body) が出現し、下等脊椎動物では、松果体自体が光受容機能を備えて時計機構を運営している。しかし、動物が進化するにつれて時計機構の中に神経制御が介入したため、松果体はしだいに内分泌器官として機能するに至ったと推察される¹⁾。さらに、松果体の生理機能については、性成熟の抑制、体色の変化、体温調節などとの関連も報告されており、まだ不明確な点が多い。

松果体は、発生学的には、第三脳室背側壁より膨出する脳室周囲器官の一つで、ほぼすべての脊椎動物に存在している。しかし、その形態及び構造面から見ると、動物によってかなりの差があり、進化の過程で光受容型から内分泌型へと大きく変遷している^{1,2)}。すなわち、松果体は、硬骨魚類では副松果体を伴ない、両生類では前頭器官を作り、さらに爬虫類では頭頂眼を伴って、いずれも光受容器官としての形態を備えている^{3,4)}。さらに、それら脊椎動物の松果体組織や松果体細胞の形態的特徴をみると、硬骨魚類の松果体細胞は網膜の錐体細胞にみられるような内節と外節を有し⁵⁾、両生類の細胞は、円筒状の内節と球状の外節を有し、いずれも光受容性に関係した意義を有するものと推察される⁶⁾。なお、爬虫類であるトカゲの松果体では、退化傾向を示す外節がまれに認められ^{7,8)}、ヘビの松果体では結合組織や血管が豊富に侵入して緻密な組織構造となり^{9,10)}、これらは両生類以下に比べると、光受容能は全体的に低下していると考えられる。一方、哺乳類の松果体は、下等脊椎動物で認められた松果体細胞の内節及び外節の構造が消失し、松果体実質は緻密な構造で、内分泌を行う腺細胞からなることが知られている^{1,6,11)}。こ

れらに比較して、鳥類の場合、ハト (Columba livia)、アヒル (Anas platyrhynchos)、及びガチョウ (Anser domesticus)の松果体組織では小胞構造が報告され^{12,13)}、ニワトリ (Gallus domesticus)の松果体組織でも、幼若期には小胞構造をみるが、加齢に伴なって腺小葉構造の実質となることが報告されている¹⁴⁻¹⁸⁾。以上のように、脊椎動物が進化するにともない松果体の機能は光受容から内分泌へとしだいに移行してゆくが、鳥類の松果体は組織学的または機能的にも進化の中間段階にあることが考えられる。Sato and Wake¹⁹⁾は、各種の鳥類の松果体について神経節細胞や神経線維の分布を調べ、スズメ目の松果体は一般に神経細胞の数が多く、求心性神経も発達して光受容機能がうかがえるが、ウズラ (Coturnix coturnix japonica)やニワトリでは神経細胞はほとんど認められず、交感神経が実質内に深く侵入して内分泌機能を示唆すると報告し、鳥類でも種によって光受容機能に差があることを指摘している。さらに、生理化学的研究によれば、松果体ホルモンであるメラトニンの松果体組織における量は、各脊椎動物を通じて、通常は明期に低く暗期に高い日周リズム (Circadian rhythm)を示すと言われている^{20,21)}。そして、下等な脊椎動物では、おそらく松果体自体が光受容機能をもち、松果体の中に備える生体時計機構により日周リズムを具現していると考えられているが²²⁾、鳥類の松果体の生理機能についてはまだ確実な報告がない。特に、ニワトリ松果体と日周リズムに関する研究の多くは生理化学的手法によって検討されたもので、それに関連する組織学的及び組織化学的検索はいまだほとんどなされていない。また現在まで、鳥類の松果体組織に関する知見と、生理化学的知見とが照合して検討されたことはほとんどない。従って、松果体の解析のためには、それらの両面からの一貫した研究が必要であると考えられる。そこでこの研究では、発生初期の胚子から成鶏に至るまでのニワトリの松果体を用いて、主にその形成過程における組織分化と機能発達の関係、及び光周期変化にともなう細胞及び組織構造の変化などを組織学的及び酵素組織化学的に検討し、

さらにメラトニンの生合成に関与するNAT（セロトニンN-アセチルトランスフェラーゼ）の活性リズムを指標として、種々の光周期変化の影響を検討することにより、鳥類の松果体の光受容機能、内分泌機能及び生体時計機構に関する特性などを総合的に明らかにしようとした。

第 II 章 ニワトリ松果体の
形成過程における組織学的変化

緒 言

脊椎動物の松果体の形態発生については早くから報告されているが⁴⁾、その発生様式は綱によって大きく異なっている。鳥類の松果体についても、その発生様式が種によって様々であり、成鳥にいたっても組織像が異なり、その組織形態が嚢胞状のスズメ目型、管状小胞状のハト・アヒル・ガチョウ型、及び腺小葉状のキジ目型の3種類に大別されることが知られている¹²⁾。しかし、いずれの場合も、形態的には、下等脊椎動物の光受容型と哺乳類の内分泌型との丁度中間型であると考えられることができる。この研究では、発生初期のニワトリ胚子から成鶏にいたる各時期の松果体について、発生にともなう組織構造や組織内酵素分布の変化を追跡し、ニワトリの松果体における組織形態の特性とその機能的変化を明らかにしようとした。

材 料 と 方 法

白色レグホーン種のニワトリを用い孵卵3日目の胚子から2年齢の成鶏にいたる期間について、各時期の松果体を検索した。すなわち、発生中の松果体について調べるためには、種卵80個を用意し、常法によって孵卵しながら、孵卵3日、3.5日、4日、5日、6日、8日、10日、12日、14日、16日、18日、20日及び21日（孵化日）の胚子から、また孵化後の松果体のためには、自然光周期下において、不断給餌給水で飼育した1日、5日、16日、18日、34日、56日、63日及び90日の各日齢及び2年齢のニワトリから、いずれも松果体を脳とともに採取し、次の様な固定及び染色を行った。すなわち、組織形態の変化を観察するためには、Bouin液を用い、3～7日間浸漬して固定及び脱灰した後、Mayerのヘマトキシリンとポリクロマチックエオシンの重染色²³⁾及びPAS反応²⁴⁾を行った。

また、一部のものについては、Carnoy液で3時間固定し、PAS反応を試みた。

さらに、酵素組織化学的検索のためには、孵卵6日目から20日目の期間について隔日に、またその後は孵化日、14日、23日、90日の各日齢及び2年齢の各ニワトリから松果体を脳とともに採取し、液化炭酸ガス上で瞬時に凍結させた後、 -15°C のクリオスタット内で厚さ $12\mu\text{m}$ の新鮮凍結切片を作製した。検索した酵素は、酸性ホスファターゼ（Barka-Anderson法²⁵⁾）、アルカリ性ホスファターゼ（Burstone法²⁶⁾）、モノアミン酸化酵素（Glennnerらの方法²⁷⁾）、及びコハク酸脱水素酵素（Nachlasらの方法²⁸⁾）であった。

結 果

1. 松果体組織の形成

孵卵3～3.5日目： 孵卵3日目に間脳蓋板の一部がわずかに膨出し、松果体原基として認められた（図1）。この時期の松果体原基は多列柱状上皮で、各細胞の基底部寄りに核が配列し、形態的には上衣層と全く区別できなかつた。なお、陥凹腔に沿って細胞分裂が多数観察された。孵卵3.5日目では、松果体原基が半球状の膨隆に発達し、細胞数も増加したが、細胞形態は孵卵3日目のものと大差なかつた。松果体の高さは約 $80\mu\text{m}$ 、実質の厚さは陥凹腔の前方部と後方部とともに $35\mu\text{m}$ 程度であった（図2）。

孵卵4日目： この時期になると、陥凹腔の前方部が幾分肥厚するとともに、松果体は少し前方に傾いていた（図3）。松果体の前方部及び後方部では柱状または立方状の実質細胞が観察された。また、側方の部位では、柱状細胞が放射状に配列した、いわゆるロゼット構造がすでに一部で形成されていた（図15）。なお、松果体の高さは $125\mu\text{m}$ になり、実質の厚さは前方部 $60\mu\text{m}$ 及び後方部 $45\mu\text{m}$ 程度で、前方部が特

に発達する傾向を示した。

孵卵 5 日目： 原基の頭頂部及び前方部では、松果体上皮から萌芽状の突出を生じ、これらは乳頭状に発達してロゼット構造を形成して、実質を拡大する経過が観察された（図 4）。また、後方部では、実質は単に重層柱状上皮の形態を示し、ロゼット構造の形成はみられなかった。なお、側方部では孵卵 4 日目に現れたロゼット構造が拡大増数し、なかには内腔を生じて小型の小胞に発達したものも少数認められた。松果体の高さは約 240 μm であった。

孵卵 6 日目： 孵卵 3 日目以降、膨出した陥凹腔は伸長して管状となり、その管壁にあたる松果体実質の前方部や頭頂部には、ロゼット構造や小胞構造が形成され、小胞の内腔に沿って多くの細胞分裂がみられた。しかし、後方部では、半球状のロゼットがわずかに萌芽状に出現した程度で組織分化が遅く、細胞は一見して未熟で、特に主管壁細胞は上衣細胞と区別できなかった（図 5）。なお、松果体の高さは約 600 μm であった。

孵卵 8 ~ 10 日目： 孵卵 6 日目以後、松果体は全体で急激に拡大し、実質が発達した。すなわち、松果体の前方部では、柱状細胞から成る大型の小胞構造が多数形成されるとともに、主管壁から新たに多くの小型小胞が新生していた。頭頂部でも小胞の形成がみられたがあまり発達せず、依然として小型のものやロゼット構造などが観察された。一方、後方部での実質形成は少なく、ロゼット構造や小型の小胞が少数観察されるに過ぎなかった（図 6 と 7）。なお、孵卵 8 日目の松果体の高さは 1.1 ~ 1.3mm で、10 日目では 1.5 ~ 1.6mm 程度となった。

孵卵 12 日目： 松果体実質はさらに拡大し、結合組織とともに血管が発達していた。小胞は特に前方部で大型化し、主管腔から遠いもの程大型化する傾向がみられた。またそれら小胞の周囲には、小胞細胞から分化して形成されたと思われる傍小胞細胞の区域（傍小胞域）が区別された（図 16）。なお、小胞細胞は明瞭な柱状細胞で、核は円形大型であ

ったが、傍小胞細胞は多角形の腺細胞様で、幾分小型円形の核を含んでいた。松果体の頭頂部では、ロゼット構造や小胞が増数していたが、依然として小胞は小型で、比較的緻密な組織構造となっていた。また、後方部では、ロゼット構造や小型の小胞がわずかに形成されており、実質の厚さも少し増加していた（図 8）。一方、当初の松果体内で第三脳室と連続していた細長い主管腔が、この時期になると脳室との連絡を失って閉鎖する個体が現れた。なお、松果体の高さは1.55~1.7 mmであった。

孵卵14~16日目： この時期の松果体は、ほぼ所定の大きさにまで拡大するとともに、大脳及び小脳の発達に従って、前方への傾斜からしだいに垂直に近い配置となった。この時期の松果体実質は、小胞構造が著しく発達していたが、たとえば孵卵14日目では、前方部の小胞細胞が多様に分化し、円形大型の核をもつ柱状細胞、すなわち松果体細胞と、幾分小型の核をもつ細長い支持細胞の2種類が明確に区別された。なお、小胞細胞の大部分は松果体細胞によって構成され、支持細胞はわずかであった。また、傍小胞域でもロゼット様構造の新生や形成途中の小型小胞が少数認められ、まれに小胞から萌芽状に突出したロゼットもみられた。なお、頭頂部及び後方部では、小胞形成はわずかで、孵卵12日目と比べて大きな変化は認められなかった（図 9と10）。松果体の高さは2.0~2.2mmで、個体によっては2.5mmに達するものも観察された。

孵卵18日目~孵化日： 松果体実質のうち特に前方部で、小胞が小型化する傾向が認められ、それにつれて周囲の傍小胞域が拡大し、実質が一層緻密となった。また、血管やリンパ細胞をともなった結合組織が発達して、実質が小葉状に分割され始め、孵化日では小葉構造が明確となった。一方、頭頂部では、多数のロゼット構造や小型小胞が観察されたが、孵化日でも小葉の形成はみられず、幾分緻密な組織構造を示す程度であった。また、後方部では、主管壁から分化した少数の小型小胞が形成され、実質の厚さを幾分増していた。一方、孵化日が近づくとつれ

て、松果体実質が拡大するため、主管腔は圧迫されてしだいに細長くなり、孵化日には全ての個体で第三脳室との連絡を失なっていた（図 11 と 12）。なお、この時期の松果体の高さは 2.1 ~ 2.7mm 程度であった。

1 ~ 5 日 齢： 松果体実質は、全体的に小胞が減少して緻密化する傾向を示したが、前方部やその側方の部位では、なお幾らかの大型小胞が残存していた。一方、傍小胞域は全般的に拡大し、その区域では、核が明調な大型細胞、核が暗調な小型細胞、及びこれらの移行型と思われる細胞などが区別された（図 18）。また、頭頂部の実質には多数のロゼット構造が存在したが、細胞は小型のまま、かなり緻密に配置されていた。一方、後方部では、ロゼット構造や小型の小胞が少数認められるに過ぎず、孵卵期間中の場合と比べて顕著な変化はなかった。すなわち、孵化後数日間の松果体組織は、一般に孵卵末期のものと同大差なかったが、松果体柄部は孵卵中のものよりもかなり細くなり、手綱交連後方まで連なっていた（図 13）。なお、松果体の高さは、約 3.0mm であった。

16 ~ 56 日 齢： この時期の松果体組織で最も特徴的なことは、小胞構造の崩壊とリンパ小節の形成であった。すなわち、これまで小葉間結合組織に分散していたリンパ細胞が、実質の前方部や頭頂部の間質中で多数集合してリンパ小節を形成し、なかには実質の約 1/3 を占める大型のものも出現した（図 17）。また、前方部の小胞では、一部の細胞が柱状から立方状に変形して小胞腔内に侵入したほか、大型小胞の分割や萎縮変形が進行し、小胞構造の崩壊がみられた。なお、松果体柄部の組織は、しだいに消失した。

63 ~ 90 日 齢： 松果体実質では、大型小胞の崩壊によって多数のロゼット構造が出現したが、それらは初期のロゼットとは形態が幾分異なり、核が比較的明るく細胞質が膨大した大型の細胞が 5 ~ 10 個程度環状配列した構造であった。また、小胞様の構造もみられたが、それらは初期のものとは異なり、それを構成する細胞は一様に短く、核は明調大型

で、基底部に偏在することもなかった（図 19）。なお、この時期では、間質中に存在した大型のリンパ小節はすでに消失し、小葉間結合組織や血管とともに多数のリンパ細胞が散在していた（図 14）。

2 年 齢： 成鶏の松果体組織は、実質細胞がロゼット様構造を示して緻密に分布し、実質内には結合組織とともに血管が豊富に侵入していた。なお、これら実質細胞の大部分は大型多角形で明調の核をもち、また小胞様の構造をつくる細胞もほぼ立方形を示していた（図 20）。松果体柄部はほとんど失われていたが、いまだ痕跡的に残存するものも認められた。なお、主管腔は実質の拡大とともに細分されていた。

2. 松果体組織の酵素分布

酸性ホスファターゼ： Barka-Anderson法²⁵⁾によれば、その酵素活性は、桃赤色のアゾ色素の顆粒の沈着として検出された。孵卵 6 日目では、酵素活性が間脳蓋板や松果体原基の陥凹壁細胞に比較的強く認められた（図 21）。また、孵卵 8 日目及び 10 日目では、松果体前方部にみられるロゼット構造や小胞を構成する柱状細胞の細胞質に検出され、特にその先端部で強活性となった（図 22）。孵卵 12 日目では、小胞や主管壁の細胞において、強い活性がみられるとともに、この頃より小胞の周囲に形成される傍小胞域の細胞にも弱い活性が散在して認められた（図 23）。孵卵 14～18 日目では、その活性は、小胞細胞はもとより傍小胞細胞でもしだいに強まったが、小胞細胞に比べて傍小胞域の活性は常に弱く、また部分的に検出されるに過ぎなかった（図 24）。孵卵 20 日目や孵化日の場合、傍小胞域の細胞全体に陽性顆粒が存在し、実質の発達にともない活性部位が拡大したが、その活性が小胞細胞よりも弱い傾向は変らなかった（図 25）。なお、この時期から小胞細胞全体に活性が認められる様になり、傍小胞細胞の活性も急激に増加した。14 日齢及び 23 日齢になると、両者の細胞ともに強い活性を示し、その差はほとんどみられなかった。90 日齢及び 2 年 齢では、ロゼット構造や小型の小胞がみられたが、これらすべての細胞の細胞質で一様に強い活性が検出

された（図 26）。

アルカリ性ホスファターゼ： Burstone法²⁶⁾によると、酵素活性は黄褐色～赤紫色のアゾ色素顆粒の沈着として検出された。この酵素活性は、孵卵8日目までの実質細胞には全く認められず、10日目で初めて小胞の柱状細胞に弱く検出された（図 27）。孵卵12日目でもその酵素活性は、10日目より幾分上昇したが極めて弱く、主管壁や小胞の柱状細胞の先端部でわずかに認められる程度であった。孵卵12日目に形成され始めた傍小胞域の場合、14日目になって初めて、弱い活性が散在的に出現した（図 28）。孵卵16日目から孵化日にかけては、小胞細胞の特に核上部や先端部でやや強い活性があり、孵化日が近づくにつれて松果体実質全体がしだいに強活性となった。なお、傍小胞細胞の活性は常に小胞細胞よりも弱かった（図 29と30）。孵化後では、孵卵期間中に比べて活性が強まる傾向を示したが、14日及び23日齢では孵卵後期と大差なく、実質全体が幾分強い活性を示すに過ぎなかった。90日齢及び2年齢になると、孵化後形成されたロゼット構造の細胞全体に比較的強い活性が検出される様になり、松果体実質全体がほぼ一様の活性となった（図 31）。なお、孵卵期間の胚子から成鶏にいたるまで、松果体被膜や小葉間結合組織には、常に著しく強い活性が検出された。

モノアミン酸化酵素： Glenner らの方法²⁷⁾によると、酵素活性は青紫色のジホルマザン顆粒の沈着として検出された。その活性は、孵卵8日目まで松果体実質内に全く検出されず、10日目及び12日目においても、一部の小胞細胞の先端部にごく弱い活性が検出される程度であった（図 32）。孵卵14日目では、小胞細胞の核上部とともに傍小胞域にも活性が認められ、活性を示す範囲が拡大した（図 33）。孵卵14日目以後では、その活性が急激に強まり、16日及び18日目の小胞及び傍小胞域では、さらに明瞭な活性がみられたが、傍小胞域の方がまだ幾分弱い傾向にあった（図 34）。孵卵20日目や孵化日になると、松果体実質全体で活性の上昇が認められ、特に小胞や主管壁の柱状細胞に一段と強く観

察されたが、傍小胞細胞では幾分弱い活性となった（図 35）。孵化後では、傍小胞域が発達拡大するとともに、それらの細胞における酵素活性が強まった。14日齢では、小胞様細胞の核上部に、強活性を示すジホルマザン顆粒が多く認められたが、その周囲の傍小胞域では顆粒状の強活性は観察されず、すべての細胞質で一様に検出された。一方、小葉間でも比較的強い活性が認められ、神経線維であることが察知された。その後、90日齢及び2年齢の松果体では、実質組織全般で強い活性が認められ、ほぼ一様に検出されるようになった。なお、小葉間に認められた神経線維の活性は、孵化後から出現してしだいに強まる傾向にあり、成鶏になると分布域も拡大していた（図 36）。

コハク酸脱水素酵素： Nachlas らの方法²⁸⁾によると、酵素活性は青紫色のジホルマザン顆粒の沈着として検出された。この酵素の場合は、孵卵8日目まで、活性が全く認められなかった。しかし、孵卵10日目になると、小胞細胞の細胞質にわずかなジホルマザン顆粒が認められ、極めて弱い活性が検出された（図 37）。また、孵卵12日目においても、10日目と同様に弱い活性となった（図 38）。孵卵14日目になると、どの小胞細胞でも一様に、核上部の先端部寄りにおいて活性が認められる様になり、傍小胞域でも所々で一段と弱い活性がみられた（図 39）。孵卵16日目及び18日目の小胞及び傍小胞域では、実質細胞の酵素活性が少し強まる傾向を示したが、実質全体では弱い活性を示すに過ぎなかった（図 40）。孵卵20日目及び孵化日になっても、小胞細胞でわずかなジホルマザン顆粒が観察されるのみで、特に活性の変化はみられなかった（図 41）。しかし、孵化後では、酵素活性はしだいに強まる傾向を示し、14日齢では、ロゼットや小胞様細胞に多量に顆粒が沈着して、活性の高まりがうかがわれた。また、傍小胞細胞でも顕著な活性が認められた。90日齢や2年齢にいたると、ロゼット構造や小型の小胞はもとより、実質全体で一様に強い活性が観察された（図 42）。

考 察

この研究で、ニワトリの松果体原基は、孵卵3日目に間脳蓋板の一部の膨出によって出現することが確認された。松果体原基の出現時期については、Spiroff²⁹⁾が孵卵開始48時間後にあたると報告し、見上と加藤³⁰⁾やCalvo and Boya³¹⁾は3日目に出現すると述べている。その後、松果体原基は、間脳上壁がさらに嚢状に膨出するとともに、膨出部の上衣細胞が増殖して肥厚したが、その肥厚した区域の各細胞は柱状細胞となって放射状に配列し、いわゆるロゼット構造や、その中心に内腔を囲む小胞構造を形成した。松果体実質のうち、脳室の膨出部にあたる主管腔の前方部では、孵卵6日目頃より組織が急速発達して小胞は大きくなり、その大型小胞と主管壁との間でさらに細胞増殖が行われて、ロゼットや小胞の形成が進行した。一方、松果体の後方部や、脳室に近い柄部では、小胞は一般に大型化せず、その後の発達も悪かった。また、孵卵12日目頃から、大型小胞の周囲では小型の多角細胞が増殖して、新たに傍小胞域が形成された。しかしその後は、実質の拡大にともなって大型小胞の変形や分割が行われ、また萌芽状小胞の突出などによって小型小胞が集積される様になり、孵化日が近づくにつれてしだいに緻密な組織となった。さらに、孵卵末期からは、結合組織や血管の発達によって松果体実質が分割され、小葉構造が明瞭となり、成鶏では松果体全体が腺組織様となった。Calvo and Boya³¹⁾は、孵卵5日目でロゼット構造が出現し、6.5日目に小胞が形成されると述べ、また西山と見上³²⁾は、7日目に内腔の明らかな小胞が認められたと報告している。しかし、筆者の観察では、すでに孵卵4日目の松果体原基の側方部にロゼット形成が認められ、6日目には前方部で内腔の明瞭な小胞が形成されていた。なお、これらの小胞は、通常は孵卵6日目に松果体主管壁から形成され始めたが、個体によっては、松果体前方部の第三脳室脈絡叢から半球状の膨隆を生じ、この膨隆より柱状細胞が分化して、松果体と同種の小胞形成が

行われた。このような小胞の形成は、ハトの松果体の発生過程でも認められており、筆者のニワトリによる観察と同様に、松果体の前方に存在する脳室上衣層からSecondary pineal evaginationとして形成されることが報告されている³³⁾。このことは、主管壁細胞及び小胞細胞が脳室上衣細胞起源の細胞であることを示す直接的な証拠とも考えられる。いずれにせよ、松果体の実質細胞がロゼット状または小胞状の組織構造を形成し、それらが発生の一時期において著しく発達拡大することは、鳥類の松果体に特有であって、それらの構成細胞を究明することが鳥類の松果体機能の把握に不可欠であると思われる。この研究における筆者の観察によれば、小胞を構成する実質細胞は2種類に区別された。すなわち、その1つは、丸味を帯た柱状細胞で、先端を小胞腔に接し、円形大型の核を基底部に備え、細胞質には微細顆粒を含んでいた。また、他の1つは、細長い柱状細胞で、幾分小型の核を備え、この細胞数は前者よりも極めて少なかった。鳥類の松果体の実質細胞の分類については、これまで、光学及び電子顕微鏡によるいろいろな報告がある。Fujie¹⁸⁾は、74日齢のニワトリの松果体実質について、松果体細胞、支持細胞及び神経膠細胞の3種類の細胞を区別し、Bischoff³⁴⁾は、成ウズラ及び成鶏の実質細胞を、光受容細胞、分泌細胞及び上衣細胞の3種類に分けた。また、Didioら¹⁶⁾は、5日齢のニワトリの実質細胞を、松果体細胞及び神経膠細胞の2種類に分類し、Oksche und von Harnack³⁵⁾は、スズメ、アヒル、ハト及びニワトリの実質細胞を、松果体細胞、上衣細胞及び血管周囲松果体細胞の3種類に分類している。彼等の報告を比較した場合、Fujie¹⁸⁾、Didioら¹⁶⁾及びOksche und von Harnack³⁵⁾の「松果体細胞」は、Bischoff³⁴⁾の「光受容細胞」及び「分泌細胞」に等しく、また、Fujie¹⁸⁾の「支持細胞」は、Bischoff³⁴⁾及びOksche und von Harnack³⁵⁾の「上衣細胞」に相当すると思われる。このような細胞の分類から考えると、筆者が観察した小胞での太く丸味を帯びた柱状細胞は前者の松果体細胞に、また、細長く細胞質の乏しい細胞は後者の支持細胞に当ると

思われる。さらに、柱状の松果体細胞は、その形態から光受容に関係すると考えられるが、孵卵中の初期には細胞が拡大するとともに、細胞質には微細顆粒が増加し、各種の酵素活性もしだいに高まって内分泌機能の発達をうかがわせた。しかし、孵卵末期から小胞構造はしだいに分裂縮小して孵化後には不明瞭となり、実質細胞は多角形の腺細胞様へと分化した。そのため、松果体組織は緻密な構造へと変化した。これら一連の形態的变化は、ニワトリの松果体細胞が光受容型として一時的に発達した後、しだいに内分泌型へと移行する経過を示しているものと思われる。従って、実際の松果体細胞について、それらを光受容細胞と分泌細胞に区別することは適当でないと考えられる。さらに、松果体の小胞構造の周囲には傍小胞域が存在し、種々の細胞が認められた。Spiroff²⁹⁾は、傍小胞細胞の起源は上衣下細胞 (Hypendymocytes) で、小胞細胞とは起源が異なると報告しているが、筆者の観察によれば、小胞細胞を含む全ての実質細胞は、同じ脳室上衣細胞から分化したものであり、松果体形成の段階で傍小胞細胞に変化するものと思われた。なお、傍小胞域の拡大にともないその周囲で結合組織が発達し、小葉構造が形成されるようになるが、その時期について、Calvo and Boya³⁰⁾及びSpiroff²⁹⁾は孵化日頃と報告していた。しかし、筆者の観察によれば、孵化日には、傍小胞域の周囲で結合組織が明瞭になる程度で、実質が発達拡大して小葉構造が明確となるのは14日齢頃と思われた。

松果体内には、間脳の膨出によって第三脳室より続く主管腔が観察された。Spiroff²⁹⁾は、主管腔と第三脳室との連絡が3ヶ月齢まで残ると述べ、Romieu and Jullien³⁶⁾は、2~3ヶ月齢のニワトリで、小胞の生産した分泌物が主管腔を通じて脳室へ送られると推察している。しかし、Calvo and Boya³¹⁾は、孵卵12~14日目のニワトリ胚子の松果体で、すでに主管腔が閉鎖すると報告している。筆者の観察によれば、主管腔の閉鎖の時期には個体差があるが、孵卵12日目から閉鎖するものも認められ、さらに主管腔と小胞腔との連絡も全く観察されなかったことか

ら、松果体小胞が分泌物を生産しても、主管腔内へは移動せず、脳室への放出はないものと思われた。

孵化後の松果体では、実質の増加にともなって、小葉間に存在するリンパ細胞が集合し、16～56日齢で著しく発達したリンパ小節が観察された。Calvo and Boya³¹⁾は、このリンパ組織が15～30日齢で急増するが、その後はしだいに減少すると報告し、大島と松尾³⁷⁾も1ヶ月齢で大型のリンパ小節を観察している。このようなリンパ小節の意義はいまだ明らかでないが、筆者の観察によれば、大型のリンパ小節は小胞構造がほぼ失われる時期に合わせて消失した。

成鶏の松果体では、豊富な脂質や核酸が含まれ、ホスファターゼ、エステラーゼ及び酸化還元酵素など種々の酵素が検出されることが報告されている³⁸⁾。さらに、筆者の酵素組織化学的研究によれば、孵卵6日目の松果体陥凹壁ですでに酸性ホスファターゼが認められ、アルカリ性ホスファターゼ、モノアミン酸化酵素及びコハク酸脱水素酵素は、孵卵10日目以後の松果体組織で出現した。これらは、組織学的には脳室上衣層から松果体実質が分化する時期に当り、Tanabeら³⁹⁾によって生理化学的に報告された、メラトニン生合成酵素のセロトニンN-アセチルトランスフェラーゼ(NAT)活性の出現時期と一致している。また、松果体のアルカリ性ホスファターゼ活性は、アカゲザル⁴⁰⁾、ブタ、ヤギ及びウマ⁴¹⁾では認められているが、ウサギ⁴²⁾及びアフリカツメガエル⁴³⁾では観察されず、動物種や検出方法によって異なった結果が得られている。この研究で、ニワトリの松果体実質には、孵卵期間中から明らかにこの酵素活性が認められ、その後漸次上昇する傾向がうかがわれた。このことから、ニワトリの松果体は退化器官ではなく、むしろしだいに機能的に働く器官であることが確かめられた。また、筆者が観察したモノアミン酸化酵素は、その出現時期がTanabeら³⁹⁾の報告したNAT活性と一致したこと、さらにその動態がBinkley and Geller⁴⁴⁾により報告されたNAT活性の経時的变化と類似することなどから、その活性の高まりは、

松果体におけるアミンの合成や代謝機能の高まりを示しているものと推察された。コハク酸脱水素酵素は、幼若鶏から成鶏の松果体で比較的強い活性を示し、特に傍小胞細胞で顕著となった。筆者らの他の研究によれば、ニワトリ松果体におけるこの酵素活性は、光周期下の明期では低いが、暗期には著しく上昇し、メラトニンの生合成によく並行することから、この活性の変化は、ニワトリの松果体が日齢を経るにともない、傍小胞域における内分泌機能が高まることを示すものと推察された。

要 約

ニワトリの松果体形成の全過程について、組織学的及び酵素組織化学的に検索し、松果体の組織発生中における機能及び形態の変化を経時的に正確に把握せんとした。松果体原基は、孵卵3日目に間脳蓋板の一部が膨出することによって出現し、上衣層の増殖肥厚によって発達した。その実質組織では、孵卵中の早期から大型の柱状細胞が、ロゼットまたは小胞構造を形成して急速に発達した。これらの細胞は、その形態から光受容機能に関係すると考えられたが、さらに、細胞内にみられる微細顆粒の動行から分泌機能を有することが察知された。その後の松果体では、小胞構造の崩壊によって実質細胞は小型となり、実質内への交感神経の侵入及びリンパ小節の発達などが進行し、実質組織はしだいに腺小葉構造となった。さらに、それらの松果体組織について酵素分布を検索すると、酸性ホスファターゼは孵卵6日目より、また、アルカリ性ホスファターゼ、モノアミン酸化酵素及びコハク酸脱水素酵素は孵卵10日目より、いずれも松果体実質細胞に出現し、各酵素活性ともしだいに上昇した。これらの結果、ニワトリの松果体は、発生初期では、特に小胞を構成する柱状細胞が主細胞として特有の機能的意義をもつが、その後は小型の多角細胞が発達して分泌機能をしめす様になり、成体の松果体は内分泌組織として機能することが確かめられた。

第Ⅲ章 ニワトリ松果体の
小胞構造とその細胞の特性

緒 言

ニワトリの松果体の組織形成に当っては、はじめは第三脳室の上皮細胞より分化したのち、孵卵6日目頃よりロゼットや小胞構造が発達するが、孵化後は小胞が次第に崩壊し、最終的には腺組織様構造となった。この期間、松果体の実質細胞の形態が柱状から多角形へと変化するとともに、小胞が小型化した^{14,15,17,45)}、発達した小胞構造では大型の柱状細胞が内腔を囲んで放射状に配列し、その柱状細胞の形態は、下等脊椎動物の松果体にみられる光受容細胞にある程度類似し、小胞は光受容構造にあたると考えられた。一方、ニワトリ松果体の神経支配に関する生理学的研究によれば、発生初期の松果体でみられる神経細胞とその求心性線維は、孵卵後期から交感神経が松果体に侵入し始めると⁴⁶⁾、しだいに退き、孵化後には松果体組織の支配神経の交代があると言われ¹⁹⁾、ニワトリの日齢に従って光受容機能が低下し、内分泌機能が高まることが示唆されている。

このように、ニワトリの松果体組織では、組織形成の過程において、形態的及び機能的にも二面性が認められるが、そのなかで、小胞を構成する柱状の松果体細胞は機能的には松果体の光周期反応に関連していると思われる。この研究では、小胞の構成細胞の機能的意義について正確に把握するため、特に柱状細胞を中心とした実質組織の詳細な組織学的及び酵素組織化学的検索を行った。

材 料 と 方 法

1. 小胞構造の組織学的検索

小胞の検索のために、孵卵18日目から56日齢のニワトリを明期に断頭屠殺して、脳とともに松果体を採取した。採取した材料をBouin液、Regaud液またはCarnoy液で固定後、パラフィンに包埋し、7 μ mの矢状

断の連続切片を作成した。なお、Bouin液固定の切片は、Mayerのヘマトキシリン・ポリクロマチックエオシン染色²³⁾、クロムヘマトキシリン・フロキシニン染色⁴⁷⁾、アルデヒドフクシン染色⁴⁸⁾、azan染色⁴⁹⁾、van Gieson染色Hansen改良法⁴⁹⁾、メチル青エオシン染色⁴⁹⁾、トルイジン染色⁵⁰⁾、リントングステン酸ヘマトキシリン染色⁴⁹⁾、Sevier-Munger鍍銀法⁵¹⁾、Cajal鍍銀法の第2法⁴⁹⁾、酸ヘマテイン法⁵²⁾、及びPAS反応²⁴⁾を行った。また、Carnoy液固定の切片については、PAS反応も試みた。なお、Regaud液固定の切片は、Regaudのヘマトキシリン染色⁴⁹⁾及びMassonトリクローム染色Goldner変法⁵³⁾を行った。さらに、松果体細胞について詳細に検討するために、松果体のみをアルコール・酢酸・ホルマリン(8:1:1)及び4%グルタルアルデヒド・0.1Mリン酸緩衝液で固定し、前者は水溶性樹脂包埋剤JB-4(Polysciences社製)に包埋した後、2 μ mの切片を作製し、また後者は、アクリトロン樹脂(三菱レーヨン社製)に包埋した後、1 μ mの切片を作製した。なお、アルコール・酢酸・ホルマリン液固定した樹脂切片は、過ヨウ素酸・メチレン青・アズールII染色⁵⁴⁾及びトルイジン染色⁵⁰⁾を行い、4%グルタルアルデヒド・0.1Mリン酸緩衝液固定の樹脂切片は、チオニン・メチレン青染色⁵⁵⁾を行った。

2. 小胞構造の酵素組織化学的検索

酵素組織化学的検索のために、脳とともに採取した松果体を液化炭酸ガス上で凍結させた後、未固定のまま、-15°Cのクリオスタット内で12 μ mの新鮮凍結切片を作製した。検出した酵素は、酸性ホスファターゼ(Barka-Anderson法²⁵⁾)、アルカリ性ホスファターゼ(Burstone法²⁶⁾)、モノアミン酸化酵素(Glennerらの方法²⁷⁾)、コハク酸脱水素酵素(Nachlasらの方法²⁸⁾)、DOPA酸化酵素(Rappaport法⁵⁶⁾)及びリパーゼ(Gomori法⁵⁷⁾)であった。

結 果

1. 小胞の組織構造

ニワトリ初生ひなの松果体組織は、豊富な血管をともなった結合組織によって囲まれ（図 43）、その実質内には、柱状細胞が放射状に配列し、中心に明瞭な内腔をもつ小胞が多数観察されたほか、小胞の周囲には、多角細胞が不規則に配列した傍小胞域が認められた（図 44）。小胞を構成している細胞には、松果体細胞と支持細胞の2種類があり、その松果体細胞が小胞の大部分を占めていた（図 45）。松果体細胞は、その基底部に円形大型の核が偏在し、先端部に細胞質突起が明瞭に観察された。この細胞間には、比較的小型の核をもつ細長い支持細胞がまれに認められた。一方、傍小胞域では、小胞細胞から分化したと思われる種々の細胞が存在し、なかでも松果体細胞と類似した大型細胞が環状配列することによって、ロゼット構造を多数形成していた。

このようなニワトリ松果体の組織構造のなかで最も特徴的な小胞の松果体細胞についてみると、小胞細胞の核上部には、微細なアルデヒドフクシン可染顆粒が一様に観察されたが（図 46）、トルイジン青可染顆粒は主として核の周囲に蓄積されていた（図 47）。また、Regaudのヘマトキシリン（図 48）やポンソー酸性フクシン（図 49）に可染の顆粒が小胞腔に面した先端部に多数偏在しており、アルデヒドフクシン可染顆粒とは分布域が異なっていた。また、小胞腔に突出した松果体細胞の細胞質突起は、エオシン、フロキシシン、アルデヒドフクシン及び塩基性タール色素で濃染した。さらに、小胞細胞を詳細に観察するために、1~2 μ mの樹脂切片を作成し、チオニン・メチレン青染色（図 50）、過ヨウ素酸・メチレン青・アズールII染色（図 51）またはトルイジン染色（図 52）を行った結果、細胞の核上部の特に核の周囲や細胞先端部に異染性を示す顆粒が緻密に存在していたが、細胞によってその数が様々であった。また、アクリトロン樹脂切片をチオニン・メチレ

ン青染色した場合のみ、小胞腔内に上記と同じ異染性を示す内容物が観察された（図 53）。

一方、傍小胞域には、核が暗調の小型細胞や核が幾分明調の大型細胞などを含む種々の細胞がみられたが、小胞細胞に比べて細胞質が乏しく、小胞細胞で認められた可染顆粒は少数で不明瞭であった（図 54）。Cajal の鍍銀法を行うと、傍小胞域には単極または双極の神経細胞をともなった微細な神経線維が観察され（図 55）、これらは間質中の神経束と連なっていた（図 56）。なお、これらとは性質の異なる大型の神経細胞もわずかに認められた。

また、酸ヘマテイン法によりリン脂質を検出したところ、小胞及び傍小胞細胞には多数の可染顆粒が認められ、さらにピリジンにより抽出を行って同様に検索すると、全く顆粒がみられなかったことから、松果体の実質細胞にはリン脂質を豊富に含有していることが察知された（図 57と58）。しかし、Sevier-Munger 鍍銀法を行っても、実質細胞全体にごくわずかな銀顆粒の沈着がみられたのみで、好銀細胞は観察されず、またクロムヘマトキシリン・フロキシニン染色、メチル青・エオシン染色及びリントングステン酸ヘマトキシリン染色によっても、可染顆粒は全く認められなかった。

小胞間では、血管やリンパ細胞とともに結合組織がよく発達していた（図 59）。さらに、アルデヒドフクシン染色（図 46）、azan染色（図 60）及びMassonトリクローム染色Goldner 変法（図 49）を行った結果、小胞間には膠原線維及び弾性線維がともに観察された。なお、PAS 反応を行ったところ、小胞細胞の先端部で微弱な陽性反応がみられたほか、結合組織や小胞腔の内容物は常に陽性であったが、明確な陽性顆粒は認められなかった（図 61）。

2. 小胞構造における酵素分布

酸性ホスファターゼ： Barka-Anderson法²⁵⁾を用いた場合、この酵素活性の部位を示すアゾ色素の顆粒は、ロゼット構造や小胞を構成する柱

状細胞の核上部に認められ、なかでも特に細胞先端部で多くの顆粒が沈着する傾向があり、著しく強い活性がみられた。また、その周囲の傍小胞細胞の活性は、小胞細胞よりも弱く、一様にみられるに過ぎなかった（図 62）。

アルカリ性ホスファターゼ： Burstone法²⁶⁾によると、その酵素活性は、黄褐色～赤紫色のアゾ色素顆粒としてロゼット構造や小胞で検出され、特に小胞細胞先端部で幾分強い活性がみられた。また、傍小胞域の活性も小胞とほぼ同程度となり、松果体実質全体で広範囲な分布が検出された。なお、松果体被膜や小胞間結合組織でも、非常に強い活性が観察された（図 63）。

モノアミン酸化酵素： Glenner らの方法²⁷⁾によると、青紫色のジホルマザン顆粒は、ロゼット構造や小胞の核上部に多数沈着し、著しく強い活性が認められた。しかし、傍小胞域の活性は小胞よりも比較的弱く、一様に観察された。また、小胞間や傍小胞域には、この酵素に陽性の神経線維が少数みられた（図 64）。

コハク酸脱水素酵素： Nachlas らの方法²⁸⁾によると、青紫色のジホルマザン顆粒は、ロゼット構造や小胞を構成する柱状細胞の核上部に弱く検出されるのみで、傍小胞域の細胞もそれらと同程度か、またはさらに弱くなる傾向を示した（図 65）。

DOPA酸化酵素： Rappaport 法⁵⁶⁾によると、この酵素でDOPAから形成されるドパキノンが、非酵素的に赤色物質であるドパクロームになることによって検出されるが、この酵素は、松果体実質には全く検出されず、松果体の被膜にのみ強い活性を示す顆粒が点在していた。また、弱い活性が小胞間の結合組織にわずかに認められる個体もあった（図 66）。

リパーゼ： Gomori法⁵⁷⁾を用いた場合、この酵素活性は、脂肪酸鉛と硫化アンモンが反応して形成された硫化鉛の黄褐色の顆粒として検出された。基質として、Tween 60を用いた場合のこの酵素活性は、松果体実

質に幾分強い活性が一様に散在していたが、局在部位は特にみられなかった（図 67）。

考 察

孵化前後のニワトリひなの松果体組織には、柱状細胞が放射状に配列した小胞構造が観察されたが、この小胞の構成細胞について、この実験では、幾分丸みを帯びた柱状細胞で、円形大型の核をもち小胞細胞の大部分を占める松果体細胞と、それらの間にまれに認められて細長い支持細胞を区別した。これらの細胞について、その染色性を詳細に検索した結果、松果体細胞には、核上部一面に散在するアルデヒドフクシン可染顆粒をはじめ、核の周囲や細胞先端部に偏在する塩基性タール色素で異染性を示す顆粒や、小胞腔側の核上部に集合したRegaudのヘマトキシリン及びポンソー酸性フクシンの可染顆粒が各々観察された。さらに、この研究の酵素組織化学的検索によれば、分泌物の生産や調節に関連する酸性ホスファターゼや、アミン類を代謝するモノアミン酸化酵素の活性は、松果体細胞で極めて強く認められ、また、膜透過性に関連するアルカリ性ホスファターゼや、TCAサイクルの一酵素であるコハク酸脱水素酵素も、幾分弱いながら検出された。すなわち、松果体細胞には、多量の可染顆粒が含まれるとともに、各種の酵素活性も存在し、細胞内における分泌顆粒の生産や盛んな代謝活動が察知された。また、これらの酵素活性は、前章の観察によれば、孵卵初期の小胞ですでに検出されて次第に強まり、小胞の崩壊にともなって実質全体の活性が上昇した。また、分泌顆粒と思われる小型の有芯顆粒が、孵卵10日目の松果体細胞で出現したのち、しだいに増数し、1ヶ月齢でほぼ最大量になることが知られていることから¹⁷⁾、松果体細胞は孵卵の比較的早期から分泌物の生産を開始し、孵化前後より次第に活発な機能を現わすものと推察された。一方、松果体細胞には、孵卵18日目から幼若期にかけて、側眼の網

膜に類似した層板状または同心円状の外節構造が認められるばかりでなく^{17,34,46)}、そこで受容した光刺激を伝達すると思われる神経細胞や求心性神経も観察されていることから¹⁹⁾、松果体細胞は光受容機能をも有するものと考えられている。従って、孵卵後期から幼若期におけるニワトリ松果体は、光受容及び内分泌の両機能を備え、両者の機能の移行期にあると思われ、小胞の崩壊が光受容機能の消失に関連することは間違いのないものと思われた。

孵化後、小胞の小型化や崩壊のよって、小胞の周囲の傍小胞域は漸次拡大したが、これらの細胞では細胞質が乏しく、可染顆粒が不明確であった。この区域は、移行型の小胞細胞を含む種々の細胞で構成されていたが、それらの細胞の機能的成熟にともなって、酸性ホスファターゼ及びモノアミン酸化酵素が強活性となり、アルカリ性ホスファターゼ及びコハク酸脱水素酵素の活性もしだいに上昇した。これらのことから、傍小胞域は腺組織として拡大することが考えられ、孵化後は松果体機能の主体が小胞から傍小胞域へと移行し、内分泌機能が高まることが明らかとなった。また、Cajal 及び Sevier-Munger の鍍銀法を行うと、特に傍小胞域では小胞間の神経束と連なった神経線維が認められ、これらと同種と思われる神経線維がモノアミン酸化酵素活性を強く示すことも観察された。なお、これらの神経線維は、孵卵17日目の松果体実質の前方部から侵入することが知られ⁴⁵⁾、孵化後急速に発達して、その分布域を拡大することが観察されている⁵⁸⁾。これらのことから、松果体機能が光受容性から内分泌性に変わることが察知される。

この研究によって、孵卵の初期から、松果体の前方部で発達する小胞細胞は、しだいに光受容機能を獲得するがそれと同時に内分泌機能をも備える様になり、受容分泌型として発達するが、孵卵後期から次第に光受容機能が弱まり、腺組織に変化することが確かめられた。

要 約

ニワトリ松果体の小胞構造と機能との関係を明らかにするため、孵卵後期から幼若期までの松果体を、組織学的及び酵素組織化学的に詳細に検索した。

孵化前後の松果体組織は、血管をともなった結合組織により囲まれた多数のロゼット及び小胞構造が観察された。それらを構成する細胞は、柱状の大型細胞でその大部分は基底部に円形大型の核を持ち、先端部に細胞質突起を備え、その核上部には、アルデヒドフクシン、Regaudのヘマトキシリン、ポンソー酸性フクシン及び塩基性タール色素に可染の微細顆粒が多数存在し、それぞれ特有の細胞内分布を示した。これらの細胞は、その形態から機能的に光受容に関係すると考えられたが、さらに多くの微細顆粒を含んでいることから、分泌細胞であることが察知された。一方、小胞構造をとりまく傍小胞域には、小胞細胞の移行型を含む小型多角細胞で構成され、それらの細胞では、微細顆粒が不明瞭であった。また、酸性ホスファターゼ及びモノアミン酸化酵素の活性は、両域ともに非常に強かったが、アルカリ性ホスファターゼ及びコハク酸脱水素酵素の活性は一様に弱く分布していた。

これらの結果、ニワトリひなの松果体は、小胞構造の発達とそれを構成する松果体細胞の形態的特性から、光受容に関係していると思われたが、その後は腺細胞様の細胞からなる傍小胞域の拡大や交感神経の侵入などから、内分泌機能を備えた器官として発達することが察知された。

第Ⅳ章 明暗光周期がニワトリ

松果体組織に及ぼす影響

結 言

これまでの研究において、ニワトリの松果体組織を詳細に観察した結果、発生の早期から、主として光受容に関係すると思われる柱状の松果体細胞の出現を確認したが、さらに電顕的には、孵卵18日目から幼若期にかけての松果体細胞に、網膜の視細胞の外節に類似した構造が認められており^{17,34,45)}、それらの柱状細胞が光受容に関係することは確実と思われる。また、生理化学的には、松果体のホルモン生産に関係するNAT活性は、孵卵10日目から認められ始め³⁹⁾、孵卵17日目からすでにNAT活性のリズムが観察されている⁴⁴⁾。これらのことから、ニワトリの松果体は、孵卵期間中から光受容能力を備えている可能性が高いが、明暗に対する松果体の組織形態の変化についてはほとんど知られていない。そこでこの研究では、発生初期から孵化日まで連続照明または連続暗黒下で孵卵したニワトリ胚子の松果体組織について、それぞれの組織構造や組織内酵素分布の変化を確かめるとともに、さらに、孵化直後から14時間照明10時間暗黒の光周期下で飼育したニワトリの松果体について明期及び暗期の組織特性を検索し、ニワトリの松果体にみられる光受容機能について究明せんとした。

材 料 と 方 法

先ず、連続照明及び連続暗黒の影響を調べるため、白色レグホーン種の受精卵150個を用い、当初は全暗黒の孵卵器内で7日間孵卵した後、孵卵8日目から連続照明区90個及び連続暗黒区60個に分けて孵卵を続け、孵卵14日、18日及び21日目（孵化日）の13時に各胚子から松果体を採取した。なお、連続照明区では、孵卵器内に10W蛍光灯2本を点灯したが、輻射熱などによる孵卵温度の上昇を防止するため、各蛍光灯の周囲を透明なビニール管で包み、それに冷却水を通して器内温度を平均

37.6℃に調節した。なお、種卵の受ける照度は、500～2000lux.で、各種卵の受光量を均一にするために、器内の卵の位置を毎日移動させた。一方、連続暗黒区では、通気性を配慮した特製の暗箱に種卵を入れ、完全に光を遮断した後、連続照明区のものと同時に同じ孵卵器内で孵卵した。

組織学的検索のために、脳とともに松果体を採取したのち、Bouin液で4～7日間、液を交換しながら固定し、70%アルコール内で3～7日間脱色を行った後、パラフィン包埋し、7μmの矢状断連続切片を作製して、Mayerのヘマトキシリン・ポリクロマチックエオシン染色²³⁾を行った。また、松果体細胞を詳細に検索するため、採取した松果体を、4%グルタルアルデヒド・0.1Mリン酸緩衝液で、4℃下で3時間固定した後、0.1Mリン酸緩衝液に移し、液を1時間毎に5～6回交換して一昼夜4℃で放置した。その後は、材料をアルコール上昇系列で脱水後、アクリトロン樹脂（三菱レーヨン社製）に包埋し、厚さ1μmの切片となし、チオニン・メチレン青染色⁵⁵⁾を行った。

さらに、酵素組織化学的検索のために、断頭屠殺後、すばやく脳とともに松果体を採取し、液化炭酸ガス上で凍結させた。その後、厚さ12μmの未固定の新鮮凍結切片を作製した。検出した酵素は、酸性ホスファターゼ（Barka-Anderson法²⁵⁾）、アルカリ性ホスファターゼ（Burstone法²⁶⁾）、モノアミン酸化酵素（Glennerらの方法²⁷⁾）及びコハク酸脱水素酵素（Nachlasらの方法²⁸⁾）であった。

次いで、明暗光周期下における組織変化を調べるためには、白色レグホーン種の初生びな70羽を用い、孵化直後から14時間照明10時間暗黒（5時点灯19時消灯）の光周期条件下で10日間飼育した。その照明には、60Wの白熱球を用い、各個体に300 lux.以上の照度を与えた。松果体の採取は、実験日当日の6時、12時、18時及び24時の各時刻に断頭屠殺したのちすみやかに行ったが、特に暗期である24時では、暗室用電球下（1～3 lux.）で採取した。

組織学的検索のためには、採取した松果体を、アルコール・酢酸・ホルマリン（8：1：1）の固定液に0℃で20分間、さらに引き続いて室温で2時間浸漬したのち、水溶性樹脂包埋剤JB-4（Polysciences社製）に包埋して、厚さ2μmの切片を作製し、トルイジン青⁵⁰⁾または過ヨウ素酸・メチレン青・アズールⅡ染色⁵⁴⁾を行ったが、組織観察のほか、400倍または1000倍で撮影した顕微鏡写真について、プランメーターや自動面積計を用いて、松果体細胞の核上部の長さや小胞域と内腔の面積を測定した。

さらに、2年齢のニワトリを用い、14時間照明10時間暗黒（5時点灯19時消灯）下の12時及び24時に断頭屠殺したのち、すばやく脳とともに松果体を採取し、液化炭酸ガス上で凍結させ、厚さ12μmの未固定の新鮮凍結切片を作製して、酵素組織化学的検索を行った。検出した酵素は、酸性ホスファターゼ（Barka-Anderson法²⁵⁾）、アルカリ性ホスファターゼ（Burstone法²⁶⁾）、モノアミン酸化酵素（Glennierらの方法²⁷⁾）、コハク酸脱水素酵素（Nachlasらの方法²⁸⁾）及びグルコース-6-リン酸脱水素酵素（Rudolph-Klein法⁵⁹⁾）であった。

結 果

1. ニワトリ胚子の松果体組織に及ぼす連続照明及び連続暗黒の影響

この実験の場合、連続的に光を照射された照明区のニワトリ胚子は、暗黒区のものに比べて孵化率が低下し、孵卵時間も約12時間短縮した。しかし、孵化日におけるひなの生体重には、両者間で有意な差は認められなかった。照明区及び暗黒区における孵化日のひなの生体重、孵化率及び孵卵時間を表1に示した。

松果体組織の変化

孵卵14日目： 暗黒区のニワトリ胚子の松果体では、第三脳室背側壁

表 1 . 孵卵中に連続照明及び連続暗黒処理した場合の孵化日のニワトリひなの生体重、孵化率及び孵卵時間

処理	生体重(g)	孵化率 (%)	孵卵時間 (日)
連続照明	40.2 ± 0.8	67	20.5-21.0
連続暗黒	41.9 ± 1.2	92	21.0-21.5

から膨出して形成された主管腔を囲んで、脳室の上衣層から分化した松果体細胞が増殖し、鳥類特有の実質組織が形成されていた。すなわち、この時期の松果体組織は、主管腔の前方部及び頭頂部で実質が主として発達したが、後方部の形成はわずかであり、それらの実質の組織構造をみると、柱状細胞が放射状に配列したロゼット構造や、内腔が発達した小胞構造がみられた。これらは、特に松果体内の前方部でよく発達し、主管腔から遠い小胞程拡大して、なかには内径が $250\mu\text{m}$ に達するものもみられた。また、前方部や頭頂部の側方に当る区域では、小胞が特に大型のものが多かった。一方、これらのロゼットや小胞構造の周囲には、不規則に並んだ多角形の細胞が分布し、いわゆる傍小胞域が形成されていた。なお、主管腔の後方部では、小胞形成はほとんどみられないばかりでなく、細胞は緻密で未分化の様子がうかがわれた（図 68）。また、暗期の松果体の主管腔は、すべての場合で脳室との連絡を失って、縦に細長い形となり、その最大幅は $30\sim 80$ （平均値 \pm 標準誤差、 54 ± 8 ） μm を示した。

一方、照明区のニワトリ胚子の松果体では、暗黒区のものに比べて、主管腔前方部の組織形成が少なく、ロゼットや少数の小胞構造が疎に分布するほか、傍小胞細胞の分化もほとんどみられなかった。また、前方部と頭頂部の側方に当る区域の組織形成も同様にわずかであった。ただ、頭頂部及び後方部の組織構成は暗黒区のものに類似し、ロゼット構造、小胞及び傍小胞域が一応形成されていた（図 71）。なお、照明区の松果体の主管腔は、最大幅が $150\sim 290$ （ 215 ± 32 ） μm と暗黒区よりも著しく広く、観察した個体の約60%が第三脳室との連絡を残していた。また脳室との連絡を失ったものでも、 $80\sim 250$ （ 141 ± 56 ） μm を示し、松果体形成の遅れが察知された。

孵卵18日目： 暗黒区の松果体では、孵卵14日目に比べて実質組織が著しく発達し、特に前方部の拡大が著明となった。その実質では、ロゼット構造が幾分減少して多数の小胞構造が形成され、小胞腔も一般に

拡大して、なかには小胞の内径が $370\ \mu\text{m}$ に達するものもみられた。また、傍小胞域も広く発達していた。この様な組織構造の発達は、松果体の他の部域でも認められ、主管腔の前方部の側方や頭頂部でも、小胞及び傍小胞域の拡大が明瞭となった。なお、後方部でも孵卵14日目に比べて実質の拡大がみられたが、小胞構造は少なく、主にロゼット構造からなっていた（図 69）。一方、松果体実質の増加にともなって主管腔はますます狭くなり、最大幅で $10\sim 60\ (43\pm 9)\ \mu\text{m}$ となった。

照明区の松果体では、同じ孵卵14日目のものに比べて明らかに組織形成が進行していたが、暗黒区の松果体と比較すると、全体的に幾分小型で、特に主管腔前方部の発達が劣っていた。すなわち、前方部の小胞構造では大型のものが少なく、さらに傍小胞域の形成もまだわずかで、暗黒区の松果体とは明らかに異なる組織像となっていた。なお、頭頂部や後方部においても、ロゼット構造や傍小胞域が観察されたが、小胞形成において暗黒区のものより確実な遅れが認められた（図 72）。主管腔は最大幅が $40\sim 190\ (119\pm 28)\ \mu\text{m}$ を示し、暗黒区の場合に比べて一般に柄部が広くなり、個体によっては第三脳室との連絡を保ったものがみられた。

孵卵21日目（孵化日）： 暗黒区の松果体では、実質全体発達拡大するとともに、前方部の小胞の増数拡大や傍小胞域の増殖も顕著となった。また、実質組織では傍小胞域の拡大によって、小胞が変形分裂する傾向が認められた。一方、間質では結合組織が発達し、小葉形成の兆候が現われていた。頭頂部や後方部の実質でも幾分拡大する傾向が認められたが、同じ孵卵18日目のものに比べて小胞構造は少なく、むしろ傍小胞細胞の増殖が認められた（図 70）。実質の増加にともなって主管腔は狭く蛇行し、最大幅が $10\sim 30\ (22\pm 4)\ \mu\text{m}$ の小管状となった。

一方、照明区の松果体では、実質の発達拡大にともない、各部位で小胞の発達や傍小胞域の形成が進行した。しかし、同じ暗黒区に比べて頭頂部や後方部の実質はまだ拡大傾向を示しているほか、前方部の傍小胞

域は少なく、発生の遅れが察知された（図 73）。主管腔は暗黒区のものよりも幾分広く、最大幅で15~130 (49 ± 18) μm で、なかには、いまだ第三脳室との連絡を残す個体も存在した。

明・暗による小胞細胞の変化

孵卵期間中の松果体組織で発達する小胞構造とその構成細胞について、暗黒及び照明の影響を詳細に検討した。

孵卵14日目： 松果体小胞には、松果体細胞と支持細胞の2種類が区別された。暗黒区では、松果体細胞は小胞の大部分を占めて、幾分丸みを帯びた柱状をなし、細胞の基部寄りに大型円形の核を含み、核の周囲及び小胞腔に突出した先端部には、チオニンに異染性を示す顆粒が緻密に偏在していた。各松果体細胞の幅は $3.1 \pm 0.1 \mu\text{m}$ （平均値 \pm 標準誤差）、細胞の高さ $19.0 \pm 0.8 \mu\text{m}$ で、その核上部の高さは $11.0 \pm 0.7 \mu\text{m}$ であり、細胞は太く高さが多様でかなりの変異を示した（図 74）。なお、支持細胞は、小型で不整形の核をもつ細長い柱状細胞で、隣接する松果体細胞間にしばしば観察された。しかし、この細胞は少数しか存在せず、暗黒区及び照明区の間でも明瞭な形態の差が観察されなかった。

一方、照明区の小胞では、松果体細胞が核の上下で急に狭くなり、明らかに細胞萎縮を示していた。その細胞内に含まれる染色顆粒も暗黒区に比べて少なく、核の周囲及び細胞先端部に散在するに過ぎなかった。なお、細胞の幅は $2.0 \pm 0.1 \mu\text{m}$ 、細胞の高さは $24.2 \pm 0.7 \mu\text{m}$ で、核上部の高さは $15.7 \pm 0.6 \mu\text{m}$ となり、暗黒区の小胞細胞に比べて高さが一様に高く、幅が著しく狭かった（図 76）。

孵卵18日目： 暗黒区の松果体における小胞の松果体細胞は、同じ孵卵14日目のものに比べて一層大型の柱状細胞となりその幅を増したが、高さは長短いろいろで、活発な細胞増殖がうかがわれた。また、核は一層大型で、異染性を示す染色顆粒も細胞質全体にわたって増加し、その

中でも核の周囲や細胞の先端部に特に密集していた。なお、各細胞の幅は、 $3.5 \pm 0.1 \mu\text{m}$ 、細胞の高さは $15.1 \pm 0.4 \mu\text{m}$ で、その核上部の高さは $8.7 \pm 0.5 \mu\text{m}$ であった。

一方、照明区の小胞では、暗黒区のものに比べて松果体細胞の数が少なく、さらにこれらの細胞はほぼ一様の長さで細長く、核は小型の楕円形または不整形を示した。しかし、同じ孵卵14日目のものに比べれば細胞は幾分拡大し、細胞内の染色顆粒も増加して、核の周囲及び細胞先端部に偏在していた。なお、細胞の幅は $2.5 \pm 0.2 \mu\text{m}$ 、細胞の高さは $18.4 \pm 0.7 \mu\text{m}$ で、その核上部の高さは $10.4 \pm 0.5 \mu\text{m}$ であった。

孵卵21日目（孵化日）： 暗黒区の小胞では、孵卵18日目よりもさらに松果体細胞が増殖し、種々の高さのものが認められた。各細胞はいずれも核が大型円形で、細胞質には染色顆粒が多く含まれた。これらの顆粒は、細胞質全般に広く分布し、特に核の周囲や細胞先端部に多く認められた（図 75）。また、細胞の幅は $3.0 \pm 0.1 \mu\text{m}$ 、細胞の高さは $15.6 \pm 0.5 \mu\text{m}$ で、その核上部の高さは $9.6 \pm 0.5 \mu\text{m}$ であった。

一方、照明区の松果体細胞は著しく細く、明らかに細胞萎縮を示し、核が多角形で小型であった。暗黒区の松果体細胞に比べて細胞は長く、染色顆粒も核の周囲や細胞先端部に緻密に偏在していた。なお、孵卵18日目と同様に、小胞における松果体細胞の数は、暗黒区のものよりも減少する傾向があった（図 77）。細胞の幅は $1.9 \pm 0.1 \mu\text{m}$ と著しく細く、細胞の長さが $18.3 \pm 0.5 \mu\text{m}$ 及び核上部の高さが $11.8 \pm 0.4 \mu\text{m}$ と高かった。

また、採取した孵卵の各時期で、両区とも小胞の内腔に異染性を示す分泌物様のものが認められたが（図 78）、このような小胞は、暗黒区の松果体よりも照明区で多くみられ、その傾向は孵卵18日目で特に顕著となった。

明・暗による各種酵素分布の変化

酸性ホスファターゼ： 孵卵14日目の暗黒区の松果体についてみると、酸性ホスファターゼ活性は、小胞の松果体細胞の特に細胞質の核上部で強く認められ、また傍小胞域は未発達のため、所々に強い活性がみられた程度であった。一方、照明区の場合では、小胞細胞の同じく核上部に活性が認められたが、その分布は暗黒区の場合に比べて、細胞質の幾分広い範囲に弱く認められた。なお、傍小胞域の活性は、暗黒区と比べて大差なかった。

孵卵18日目の松果体では、暗黒区の場合、小胞細胞の核上部で強い活性が示されたが、その分布域は狭く、特に核上部の内腔面側で強活性であった。なお、傍小胞域では、組織の拡大によって酵素分布域が広がり、孵卵14日目よりも活性が強まったが、小胞域よりは弱かった。一方、照明区についてみると、その分布域は暗黒区のものに類似したが、その活性が比較的弱く、光照射による活性低下が察知された。

孵卵21日目（孵化日）の松果体では、暗黒区で、小胞細胞の活性が核上部で著しく強くなるとともに、細胞質全体にも分布していた。また、傍小胞域の活性は小胞域よりも幾分弱かった。しかし、照明区では、小胞細胞の酵素活性は幾分弱かったが、核上部の先端に近く狭い範囲で強くなる傾向があった。なお、傍小胞域の酵素活性は暗黒区に比べて幾分低下したが、著しい変化はみられなかった（図 79と81）。

アルカリ性ホスファターゼ： 孵卵14日目の暗黒区の松果体では、結合組織はもとより、小胞細胞の細胞質に微細な陽性顆粒が認められ、細胞先端部で明瞭な活性が示された。しかし、照明区の実質組織では活性がほとんど検出されず、わずかに小胞細胞の先端部に陽性顆粒をみる程度であった。

孵卵18日目の場合、暗黒区では、小胞や傍小胞域の活性が14日目よりも全体的に強まり、特に小胞細胞先端部で強い活性が認められた。しかし、照明区では、小胞細胞の先端部でわずかに活性が認められる程度

で、実質全体では暗黒区よりも明らかに弱かった。

孵卵21日目（孵化日）の場合、暗黒区では、小胞細胞の特に先端部で検出され、傍小胞域では孵卵18日目よりもやや強まったが、全体的にみて活性が弱かった。一方、照明区では、小胞細胞の内腔面側や傍小胞細胞の全体にわたり、暗黒区よりも幾分強く認められた（図 80と82）。

モノアミン酸化酵素： 孵卵14日目の場合、暗黒区の松果体では酵素活性が主管壁細胞や小胞細胞に弱く認められた。また、照明区でも暗黒区と同様に、小胞細胞の核上部で微弱な活性がみられた。

孵卵18日目の暗黒区の酵素活性は、松果体の実質全域で強まったが、実質内での部域差は特にみられなかった。また、照明区では一般に活性が弱かったが、なかでも核上部の活性のみは暗黒区よりも幾分強く、その範囲も拡大してみられた。

孵卵21日目（孵化日）の暗黒区の場合、活性は小胞細胞の核の周囲や核上部に少なく、先端部では明瞭であった。また、傍小胞細胞も小胞細胞と同様強い活性を示したが、小胞細胞よりは幾分弱い傾向があった。一方、照明区では、小胞細胞の核上部にのみ強く検出され、他は幾分弱い活性となった（図 83と85）。

コハク酸脱水素酵素： 両区ともに孵卵期間を通じて、松果体実質細胞で一様に弱い活性が認められた。なお、照明区では暗黒区に比べて、小胞細胞の核上部及び傍小胞域で幾分活性が強い傾向がみられた（図 84と86）。

2. 明暗光周期下における組織変化

松果体の組織構造

ニワトリひなの松果体組織のうちで、最も特有な実質組織として観察された小胞構造と、その構成細胞の日周変化について詳細に検討した。

6時（明期開始1時間後）における小胞の松果体細胞は、いずれも核が小型で、その形状も円形、楕円形及び扁平など様々であったが、細胞

質は一様に短く、核の上下で幾分細くなっていた。その核上部の高さは、 $10.9 \pm 0.1 \mu\text{m}$ （平均値±標準誤差、 $n = 558$ ）と幾分短かった。なお、支持細胞は、小型で不整形の核をもつ細長い柱状細胞で、松果体細胞間でしばしば観察された。しかし、この細胞は少数しか存在せず、1日の各時間で明瞭な形態の差が観察されなかった（図 87と88）。

12時（明期開始7時間後）における松果体細胞は、6時のものに比べて各細胞とも全体的に長く一様で、幾分大型で楕円形の核を含み、その核上部の高さは、 $11.6 \pm 0.1 \mu\text{m}$ （ $n = 771$ ）であった（図 89と90）。

18時（暗期開始1時間前）における松果体細胞には、12時のものと同様同じ大きさの円形または楕円形の核が存在し、細胞質もさらに一様に長く、幅も一層広くなる傾向が認められた。その核上部の高さは、 $11.8 \pm 0.1 \mu\text{m}$ （ $n = 729$ ）と、1日のうちで最も高かった（図 91と92）。

24時（暗期開始5時間後）における松果体細胞は、円形大型の核を有していたが、その細胞質が18時のものより幾分丸みを帯び、一様に短かった。その核上部の高さは、 $10.5 \pm 0.1 \mu\text{m}$ （ $n = 673$ ）と、1日のうちで最も低かった（図 93と94）。

これらの結果、松果体細胞の核は、暗期が近づくにつれて次第に円形大型となる傾向があり、暗期で最大になると思われた。しかし、その細胞質は、明期開始後次第に核上部の高さを増して、明期後半で最も高くなったが、暗期に入ると急激に短くなる傾向があった。これらの核上部を測定した数値を、Newman-Keuls法⁶⁰⁾によって統計処理したところ、12時及び18時の明期に採取した松果体細胞の核上部の長さは、6時及び24時の時期のものに比べて、危険率1%で有意に高かった。また、松果体細胞には、塩基性タール色素で異染性を示す可染顆粒が認められ、核の周囲や、細胞の先端部には多く偏在していた。しかし、この顆粒の数は、同じ松果体実質内の各小胞、さらには小胞細胞によってもかなり異なることから、実質内には機能的な差をもつ種々の細胞が混在し、その総和がその時期における機能にあたるものと思われた。すなわち、松果

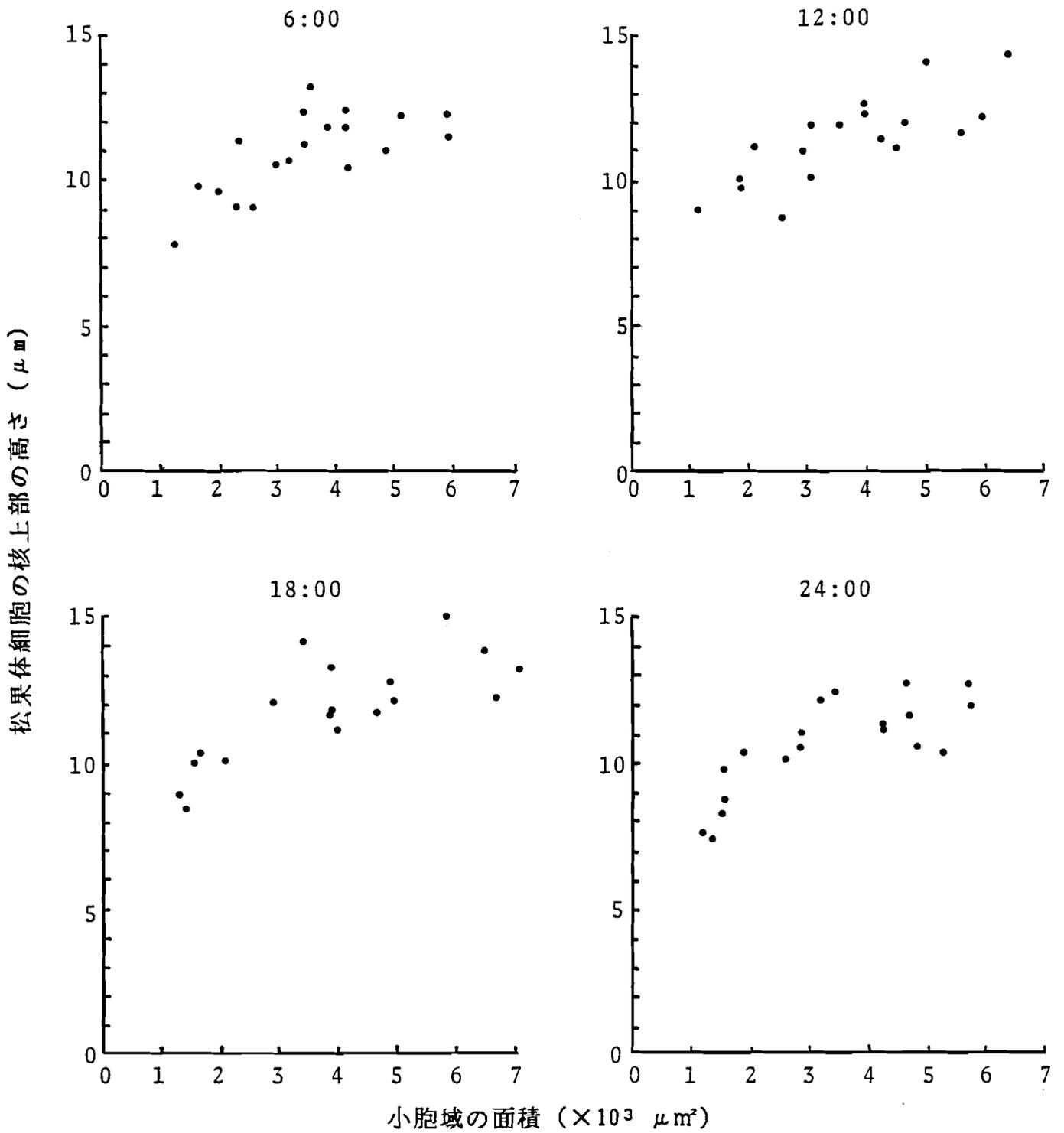


図 95 明暗光周期下で見られるニワトリひなの松果体における小胞域の面積と松果体細胞の核上部の高さとの関係

体の細胞質における時間的な変化は、1日の光周期条件下では明確に認められなかった。

また、1日の各時期に採取した松果体における小胞域の面積と、その小胞を構成している松果体細胞の核上部の高さとの関係を図95に示したが、いずれの採取時刻においても、小胞域の面積が広くなるにつれて核上部が高くなった。また、面積が $3000\ \mu\text{m}^2$ 以上の大型の小胞について、松果体細胞の核上部の長さを比較すると、12時及び18時、特に18時に採取したものは、6時及び24時のものに比べて、核上部が高くなる傾向がみられた。

松果体の酵素分布

酸性ホスファターゼについてみると、12時（明期）の松果体では酵素活性は、小胞及びロゼット構造の構成細胞の特に細胞質核上部に強く認められ、またその周囲の傍小胞細胞にも活性が一樣にみられた（図96）。一方、24時（暗期）の松果体の場合、同じく小胞やロゼット構造の細胞の核上部に活性が強くみられるとともに、その周囲の傍小胞細胞の活性も、12時のものと比べて一樣に強活性であった（図99）。

アルカリ性ホスファターゼについてみると、12時（明期）の松果体では、結合組織はもとより、小胞及びロゼット構造の細胞の特に核上部で比較的強い活性が認められ、また傍小胞細胞にも一樣に活性が観察された（図97）。また、24時（暗期）の松果体の場合、実質全体で活性が上昇し、小胞やロゼット構造の構成細胞及び傍小胞細胞ともに強い活性が認められた（図100）。

モノアミン酸化酵素についてみると、12時（明期）の松果体では、小胞やロゼット構造に強い活性が認められ、実質全体で一樣に検出された（図98）。また、24時（暗期）の松果体の場合も12時と同じく、小胞やロゼット構造及び傍小胞域で一樣に強い活性が認められた（図101）。なお、間質には両時刻ともに、この酵素に陽性の神経線維が多数

観察された。

コハク酸脱水素酵素の場合、12時（明期）の松果体では、小胞はもとより実質全体でやや強い活性がみられた（図 102）。しかし、24時（暗期）になると、小胞やロゼット構造の活性は弱まり、ジホルマザン顆粒がわずかに沈着するに過ぎなかった。しかし、その周囲の傍小胞域では著しく強い活性が認められた（図 104）。

グルコース - 6 - リン酸脱水素酵素では、12時（明期）の松果体実質には、全く活性が認められなかった（図 103）。しかし、24時（暗期）になると活性が増し、小胞はもとより実質全体でジホルマザン顆粒が一樣に沈着して弱い活性が観察された（図 105）。

これらのことから、成鶏の松果体になると、小胞細胞よりも腺細胞に類似した傍小胞細胞において、各酵素の活性が高まり、主に暗期において、その機能的活発化が現われるものと推察された。

考 察

孵卵中のニワトリ胚子を連続照明した場合、孵卵時間の短縮や孵化率の低下が起ることが知られている。たとえば、孵卵時間に対する光照射の影響は、孵卵開始当初の1週間が最も強く、この期間の光照射のみで孵卵時間が約15時間短縮すると言われ⁶¹⁾、また孵卵中の連続照明により孵化率が著しく低下する（対照区 69%、処理区 15%）と報告されている⁶²⁾。さらに、孵卵温度が高温（38.5～39.5℃）になると孵化時期が早まり、同時にひなの生体重が減ることも説明されている⁶³⁾。従って、本実験では、連続照明を孵卵開始1週間後より行い、また照明による温度上昇を回避するため、冷却水による孵卵器内の温度調節を試みた。それらの結果、照明区の孵卵時間は暗黒区のものに比べて約12時間短縮したが、両区の間でひなの生体重には差がなく、孵卵中における個体発生の経過にも特に異常はないものと思われた。

ニワトリ松果体の組織発生についてはすでに報告したが、著者のこの研究の場合、孵卵中に光を完全に遮断した暗黒区では、松果体はほぼ正常に発達し、小胞構造や傍小胞域の形成も順調に進行した。しかし、照明区のニワトリ胚で孵卵8日目以後、光照射を続けた松果体では、孵卵14日目で少数の小型小胞が形成されていたに過ぎず、18日目でようやくかなりの数の小胞形成が認められた。さらに、孵化日には、大型の小胞が多数存在して、小胞構造の崩壊減少が遅れ、小葉構造もまだ未発達であった。Calvo and Boya³¹⁾によれば、正常なニワトリ胚子の松果体主管腔と脳室との連絡は、孵卵12~14日目に閉鎖すると言われているが、著者の実験でも、暗黒区では主管腔が急速に縮小して、孵卵14日目で全個体が第三脳室との連絡を断っていた。しかし、照明区では主管腔の縮小が遅れて、孵化日まで脳室との連絡を残すものが認められ、松果体の組織形成は光照射によって抑制され、遅延することが明らかとなった。

鳥類の松果体の発生過程では、一般的に小胞構造の時期を経過するが^{12,29-31,64)}、これらの小胞は、松果体細胞と支持細胞から構成されている。このうち松果体細胞は、胚子期で外節の層板状構造が認められ¹⁷⁾、幼若期でも同心円状の層板構造が存在して^{34,45)}、網膜の視細胞と類似しているので、直接光を受容している可能性が示唆されている。近年、Senn and Demaine⁶⁵⁾は、ハトを用いた電気生理学的検索の結果、鳥類の松果体も光受容することを初めて証明した。一方、松果体細胞には、大型及び小型の分泌顆粒が胚子期から成鶏まで認められ^{17,18,32,34)}、さらに、その分泌顆粒が細胞先端に集合し、小胞の内腔に放出されることが観察されている³⁴⁾。この研究で暗黒区の松果体を詳細に観察した結果、小胞細胞の核上部にはチオニンに異染性を示す染色顆粒が多く存在し、これと同じ染色性を示す可染物が小胞腔内にも認められたほか、細胞内には分泌物生産に関連すると思われる酸性ホスファターゼや、膜透過性に関係すると思われるアルカリ性ホスファターゼなどの酵素活性が、核上部で強く観察され、松果体の小胞は分泌物の生産、蓄積及び放出に関与してい

ることが察知された。これに比べ、照明区の松果体では、暗黒区のものに比べて細胞分裂像を示す細胞が少なく、松果体細胞は明らかに萎縮し、細胞内の染色顆粒も減少して、核の周囲と細胞の先端部に偏在するのみで、細胞の機能低下がうかがわれた。なお、小胞腔内に可染物をもつ小胞は、照明区の方が多く観察された。また、小胞細胞の核上部におけるアルカリ性ホスファターゼ活性は暗黒区よりも強くなり、酸性ホスファターゼ活性は弱くなる傾向が認められることから、松果体の分泌能は光照射によって低下するものと思われた。本実験の小胞では、松果体細胞に観察される可染顆粒の量は小胞によって異なっていたが、和氣¹¹⁾は、松果体細胞のうち、小胞が求心性神経でとりかこまれたものは光受容性が強く、交感神経でとりかこまれたものは内分泌性要素が強いことを示唆し、小胞及びそれを構成している松果体細胞のうちでも、光受容機能または内分泌機能に差があることを指摘している。なお、傍小胞域における各酵素活性を検索したところ、いずれの酵素も傍小胞細胞の活性は、孵卵中では小胞細胞よりも常に弱く、また光照射によって、傍小胞域の酸性ホスファターゼやモノアミン酸化酵素の活性が明らかに低下したことから、光照射は傍小胞細胞の分泌物生産をも抑制することが察知された。なお、ラットに連続照明処理を行うと、松果体のコハク酸脱水素酵素活性は顕著に抑制されることが報告されている⁶⁶⁾。

この研究で、明暗光周期にともなうニワトリの松果体組織の変化を詳細に検討した結果、松果体細胞は、明期に入るとともにしだいに拡大し、明期後半で最大となったが、暗期に入ると急激に縮小し、暗期半ばから明期初めにかけて最小となることが観察された。また、松果体細胞の核は、明期後半から暗期が近づくにつれて円形大型となり、暗期で最大となることも明らかとなった。このような細胞形態にみられる日周リズムについては、今まで哺乳類について、松果体細胞の大きさ^{67,68)}、その核と核小体の大きさ^{68,69)}や形態⁷⁰⁾、細胞分裂の頻度^{69,71,72)}、有芯顆粒^{68,73,74)}やシナプスリボンの数^{68,75-77)}、グリコーゲン含量⁶⁷⁾などの変化が報告され

ているが、これらのうち、シナプスリボンの数を除いていずれも明期に増加する日周リズムを示すと言われている。しかし、鳥類では、組織形態にみられる日周変化の報告は少なく、松果体重量⁷⁸⁾や松果体細胞の大きさ⁴⁵⁾などについて少数の報告があるに過ぎない。すなわち、それらの報告によれば、松果体重量は連続暗黒では減少し、また、明暗光周期下における松果体細胞は、暗期よりも明期の方が大きくなる傾向があると言われている。本実験の場合にも、松果体細胞の体積が明暗光周期にしたがって増減し、それによって松果体重量の日周変化があるものと推察されたが、特に大型の小胞が明瞭に変化することが確かめられた。なお、これらの小胞にみられる松果体細胞は、明期の半ばから後半にかけて特に大型となる傾向が確認され、暗期に高いことが知られるメラトニン生合成リズムに先行する位相を示した。

一方、明暗光周期にともなった各酵素活性の変化をみると、酸性ホスファターゼは、明期でロゼット構造や小胞細胞で強く、暗期ではさらに小胞周囲の傍小胞域でも強まる傾向がみられた。また、アルカリ性ホスファターゼは、明期ではロゼット構造で強い活性が認められ、暗期になると傍小胞域で幾分強まる傾向が観察された。しかし、モノアミン酸化酵素は、明期と暗期との間に酵素活性や分布域の差はなく、日周変動は認められなかった。Axelrod ら⁷⁸⁾も生理化学的解析から、モノアミン酸化酵素活性には日周リズムがないことを報告している。なお、コハク酸脱水素酵素は明期の小胞細胞に幾分強くなったが、暗期になると、それらの活性は弱まり、むしろ傍小胞域で急激に上昇することが観察された。これらのことから、小胞細胞は明期で、また傍小胞細胞は暗期で高エネルギーリン酸結合が高まるものと考えられ、両者の細胞の機能的相違が察知された。また、核酸の材料であるリボース-5-リン酸を生産するペントースリン酸経路の酵素であるグルコース-6-リン酸脱水素酵素は、明期では松果体実質にほとんどみられなかったが、暗期になると活性が幾分上昇し、ロゼット構造や小胞で弱い活性が認められた。以

上の結果から、明期では主にロゼット構造や小胞の柱状細胞が分泌物を生産し、その大きさを増すが、暗期になると小胞細胞に加えて、そのまわりの腺細胞に類似した傍小胞細胞の代謝活動がさかんとなり、松果体全体の機能の亢進が察知された。なお、このように松果体細胞で認めた明期及び暗期の酸性ホスファターゼ、コハク酸脱水素酵素及びグルコース-6-リン酸脱水素酵素の活性や分布域の動態は、松果体機能の変動をみる上での組織化学的指標となるものと思われた。

要 約

明暗による松果体の組織変化を確かめるため、先ず、孵卵中のニワトリ胚子の松果体に対する連続照明または連続暗黒の影響を検索した結果、暗黒区の松果体は順調に発達して多数の小胞構造が形成されたのち、孵化日頃より実質の緻密化や小葉化が進行し、さらに、実質における酸性及びアルカリ性ホスファターゼ、モノアミン酸化酵素及びコハク酸脱水素酵素の各酵素活性はしだいに高くなった。しかし、孵卵8日目から連続照明した松果体の場合、孵卵14日目には、小胞構造は暗黒区に比べて著しく少数で、孵卵18日目や孵化日の松果体でも、組織の発達が明らかに抑制され、酸性ホスファターゼ及びモノアミン酸化酵素の活性は、暗黒区よりも常に弱くなった。さらに、照明区の松果体細胞は暗黒区のものに比べて明らかに萎縮して細長く、染色顆粒が減少し、孵卵中のニワトリ胚子の松果体は明らかに外界の光に反応し、組織形成及び機能発達もともに低下することが確かめられた。さらに、初生ひなを用い、14時間照明10時間暗黒の明暗光周期下で飼育し、松果体組織の周期変化について検索した結果、まず大型小胞の松果体細胞が明期後半から拡大して暗期に最大となり、その後半では最小となったが、それらの核も、暗期が近づくにつれて拡大した。また、酵素組織化学的にみると、酸性ホスファターゼ、アルカリ性ホスファターゼ、コハク酸脱水素酵素

及びグルコース - 6 - リン酸脱水素酵素の活性は、暗期において特に傍小胞域で上昇する傾向を示した。以上のことから、松果体細胞は、明期末から次第に機能的となり、傍小胞細胞とともに暗期において機能を高めるリズムが存在することが察知された。

第Ⅴ章 ニワトリひな松果体
におけるセロトニン N - アセ
チルトランスフェラーゼ活性
の光周期変化

結 言

松果体が生産する有効物質として最も有力なものは、メラトニンと考
えられている。このメラトニンは、Lernerら⁷⁹⁾が牛松果体から初めて単
離し、その構造を決定した。その後メラトニンの生合成過程について、
トリプトファンから5-ヒドロキシトリプトファンを経てセロトニンと
なった後^{80,81)}、セロトニン N-アセチルトランスフェラーゼ (NAT) の
介在によって N-アセチルセロトニンとなり⁸²⁾、次いでヒドロキシイン
ドール - O-メチルトランスフェラーゼによりメラトニンになることが
明らかにされた⁸³⁾ (図 106)。さらに、これらメラトニン生合成の中間
物質や酵素活性について検討した結果、松果体のセロトニン含量は明期
に⁸⁴⁾、またメラトニン含量は暗期にそれぞれ高い日周リズムを示すこと
が明らかとなり⁸⁵⁻⁸⁷⁾、インドールアミンの合成リズムに反映して酵素活
性の変動があることが確かめられた。実際に、Klein and Weller²⁰⁾は、
ラットの松果体において、NAT活性が明期より暗期に15倍高い顕著な
日周リズムを示すことを明らかにし、Binkleyら²¹⁾は、ニワトリの松果
体においても同様に、NAT活性の日周リズムを観察している。さらに
Binkleyら^{88,89)}は、鳥類の松果体における光受容機能について明らかにす
るため、ニワトリを用い、松果体のNATリズムと光周期との関係を検
討した結果、暗期での光照射がNAT活性を抑制すること、明期での暗
黒処理は、暗黒開始(消灯)予定時刻のみNAT活性を上昇させること
を報告し、さらに光周期の暗期時間が長くなる程、NAT活性が減少す
ると述べている。しかし、これまでの報告は、鳥類の松果体のメラトニ
ン生合成に対する光照射や、暗黒処理の直接的な効果のみ検討したにと
どまり、松果体の光受容機能や内分泌機能、または生体時計機構など
との関連については全く考慮していない。この研究では、ニワトリひなを
用い、種々の光周期変化の下における松果体のNATリズムの特性を検
討し、メラトニン生合成に及ぼす光の影響を明らかにしようとした。

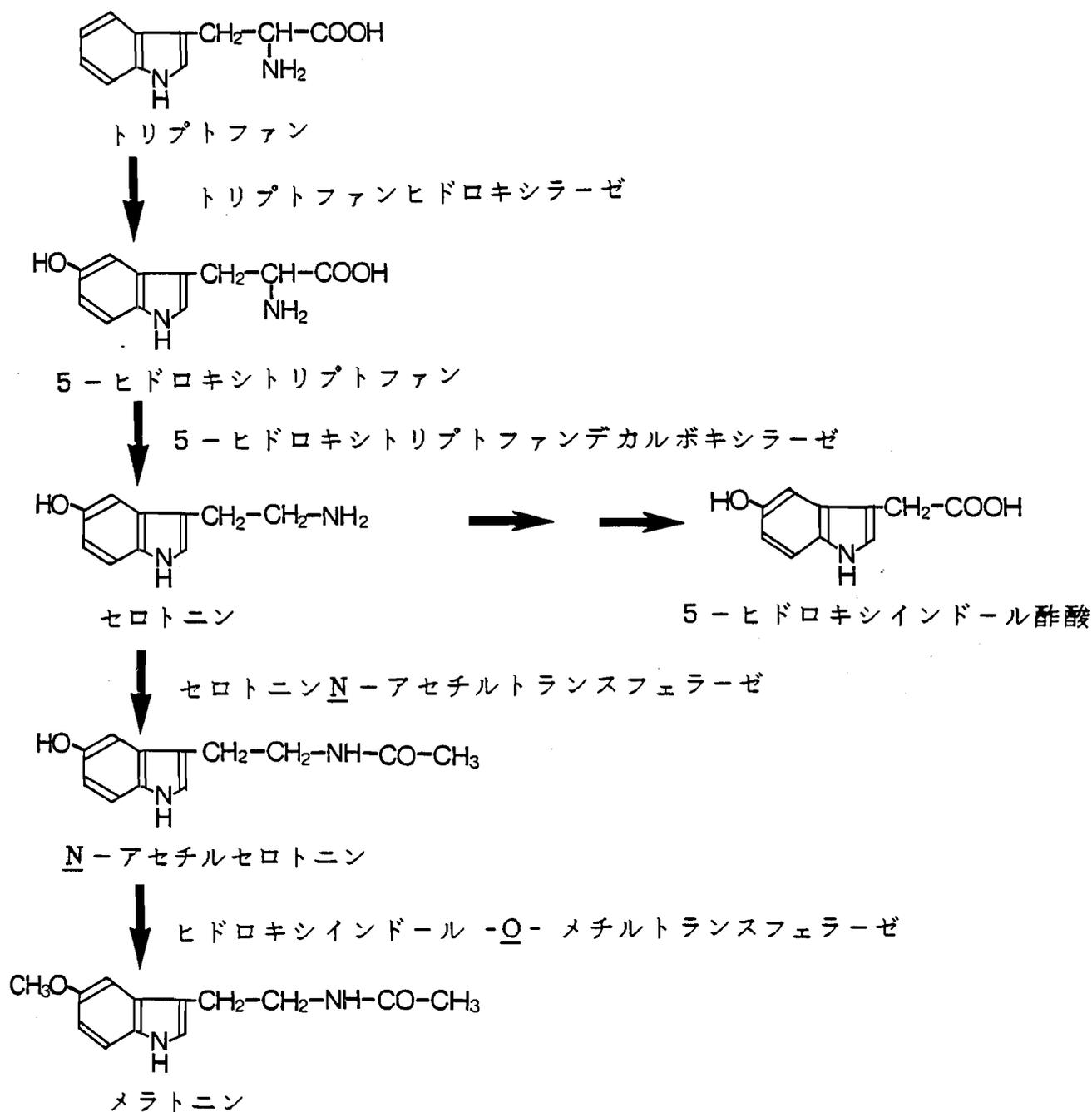


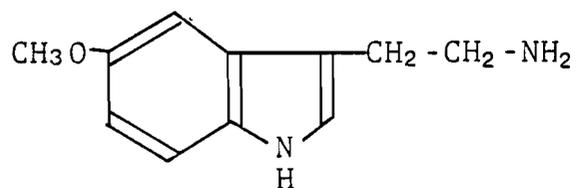
図 106 松果体におけるメラトニンの生合成経路

材 料 と 方 法

雄ニワトリの初生びな1356羽を用い、14時間照明10時間暗黒（5時点19時消灯）、または12時間照明12時間暗黒（6時点灯18時消灯）の光1日期下で、不断給餌給水しながら飼育し、13～42日齢で実験に供した。照明のための光源は、60W及び100Wの電球、または15W及び40Wの蛍光灯を使用し、各実験条件に従って光周期を設定した。照度は、すべての場合で200～300 lux.であった。

松果体のNAT活性の測定法及び計算方法は、Deguchiの報告^{90,91)}に準じて行った。各区のニワトリについて、松果体のNAT活性を測定するためには、断頭屠殺後ただちに頭を水中に埋め、10～15分間放置し、よく冷却させた後、すばやく暗室用赤色電球（1～3 lux.）下で松果体を採取し、あらかじめ冷却したガラス製マイクロホモゲナイザーの内側に松果体を付着させた。暗室内で慎重にホモゲナイズし、40℃で10分間インキュベートし、インキュベーション終了時に、0.5 Mホウ酸緩衝液（pH 10）0.5 ml加え、酵素反応を停止させたのち、その全量をガラス製抽出管（10×105 mm，円錐型 10 ml用）に移し、その中にトルエン/イソアミルアルコール混合液（97：3，v/v）5 ml加え、Vortex型ミキサーで1分間攪拌して、メラトニン-¹⁴Cを抽出した。その後、3000 rpmで10分間遠心分離し、その上清2 mlをトルエンシンチレーター9 mlに移し、軽く攪拌した後、液体シンチレーションカウンター（LS 9000，Irvine，California，Beckman社製）で通常5分間測定した。測定したdpm値から、次の方法により松果体のNAT活性を算出した。

反応溶液の基質（5-メソキトリプタミン）、補酵素（アセチル-¹⁴C CoA）、ならびに松果体組織由来のNAT酵素により、図107に示した酵素反応が起こるが、反応生成物は、5-メソキトリプタミンがアセチル化し、¹⁴CでラベルされたN-アセチル5-メソキトリプタミン、すなわちメラトニン-¹⁴Cと、アセチル基のとれたCoAである。ま



5-メソキシトリプタミン

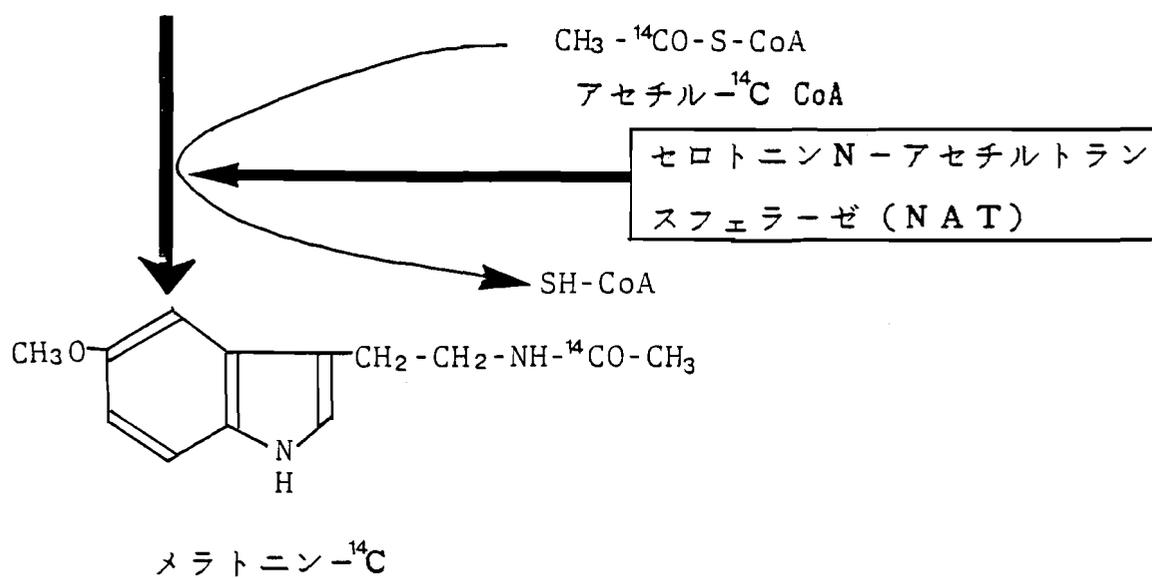


図 107 5-メソキシトリプタミンを基質とした場合のNAT酵素反応

た、反応に使用されなかった5-メソキシトリプタミン、及びアセチル ^{14}C CoAも、反応終了後の反応溶液に存在すると思われる。そこで、このような反応が終了した溶液の抽出操作を行うと、アセチル ^{14}C CoAは水溶性、またメラトニン ^{14}C は脂溶性であるため、メラトニン ^{14}C は、トルエン/イソアミルアルコール層に移る。その後、遠心分離することにより、上清にトルエン/イソアミルアルコールを集め、その上清から2 mlとり、その放射能を測定した。

$$\frac{\text{試料のカウント値 (dpm)} - \text{ブランク値 (dpm)}}{2.22 \times \text{使用したアセチル-}^{14}\text{C CoA の比放射能 (mCi/mmole)}} \times 2.5$$

1 pCi = 2.22 dpmであるので、使用したアセチル ^{14}C CoAの比放射能 (mCi/mmole = pCi/pmole)値に2.22を乗じたこの式の分母は、アセチル ^{14}C CoA 1 pmoleあたりの dpm値となる。また分子は、各試料が示す真の dpm値である。従って、アセチル ^{14}C CoA 1 pmoleに対して、メラトニン ^{14}C が1 pmole生成されることより、この式から、酵素反応で生成されたメラトニン ^{14}C の pmole数を算出することができる。また、抽出の際トルエン/イソアミルアルコール混合液を5 ml使用したが、その内の2 mlを測定したため、最後に2.5倍した。なお、算出された値は、松果体1個のホモゲネートを含む反応液を10分間インキュベートしたため、pmoles/10min./松果体と表わされ、これを松果体のNAT活性値とした。

結 果

1. NAT活性の日周リズム

16日齢及び42日齢雄ひなの松果体におけるNAT活性の日周リズムを、図108に示した。

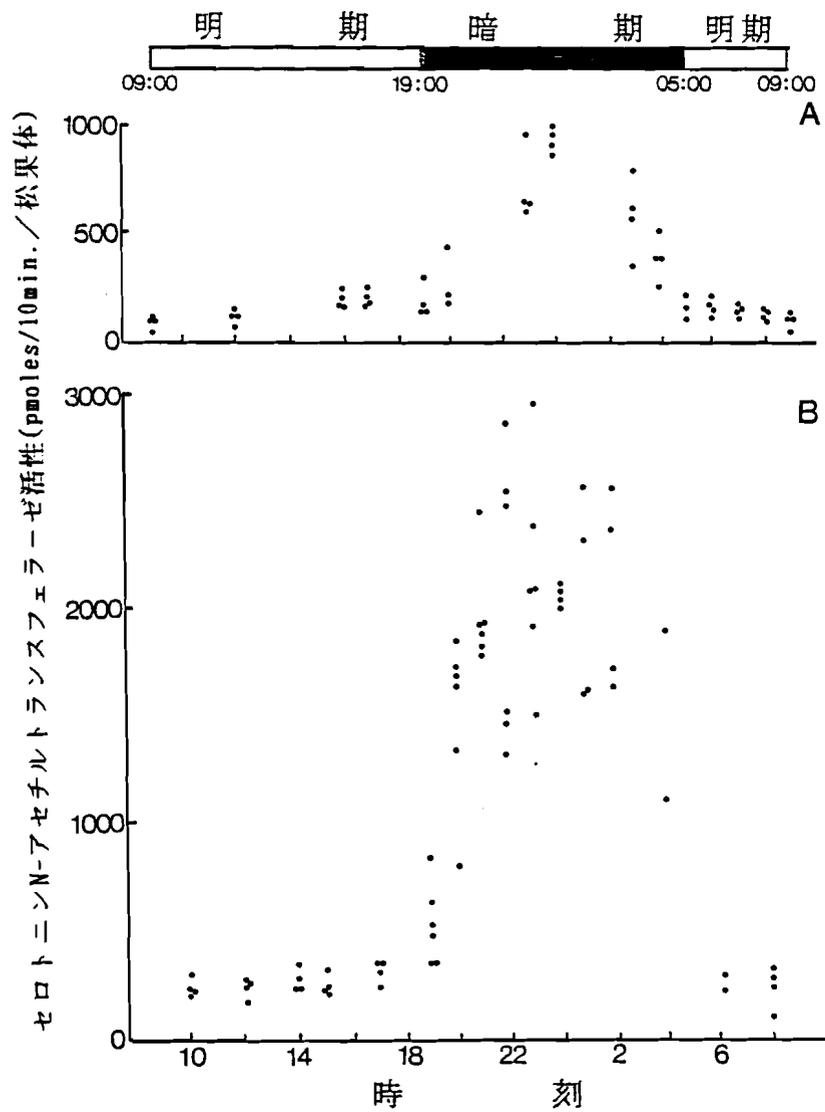


図 108 14時間照明10時間暗黒下で飼育した16日齢 (A)及び42日齢 (B)の雄ニワトリひなの松果体におけるNAT活性の日周リズム。各点は、個々の松果体のNAT活性をあらわす。

14時間照明10時間暗黒の光周期下において、対照とした16日齢の松果体のNAT活性は、照明下の5時、6時、7時、8時、9時、12時、16時及び17時では低く抑制されていたが、19時消灯後は時間の経過とともに上昇した。消灯4時間後の23時には、NAT活性が暗期の最高値に達したが、3時、4時及び5時（点灯直前）には活性が点灯前にもかかわらず、すでに減少傾向を示し、点灯後は明期の低い値を維持した。

42日齢の松果体のNAT活性は、照明下の6時、8時、10時、12時、14時、15時及び17時では抑制され、低い値を維持したが、19時の消灯直後ですでにわずかな上昇傾向を示し、その後も時間の経過とともに活性が高くなり、消灯2時間後の21時で最高値に達し、2時までその高いレベルを維持した。しかし、点灯1時間前の4時には明らかに減少傾向となり、点灯1時間後の6時及び8時には活性が著しく抑制され、明期の低い値を維持した。

以上のように、両日齢のひなとともに松果体のNAT活性は、顕著な日周リズムを示し、日齢を経るとともに、明期及び暗期の活性値は上昇していたが、明期に対する暗期の酵素活性比は約9倍と一定に保たれていた。

2. 暗期に光照射した場合のNAT活性の変化

暗期途中の23時に、42日齢雄ひなに200~300 lux.の光を照射した後の松果体NAT活性の変化を調べるための実験デザインと、その結果を図109に、またそれらの数値を表2に示した。

照明処理直前の23時のNAT活性は、松果体1個あたり10分間インキュベーションを行って、平均2154.7 pmolesであった。しかし、点灯30分後では、統計的に有意（危険率5%）に活性が抑制されて、約1/2になり、点灯1時間及び3時間後では、約1/3にまで強く抑制された。なお、点灯1~3時間後の活性値は統計的に有意ではなかったが、明期の17時及び19時の低い活性値にまでは抑制されなかった。

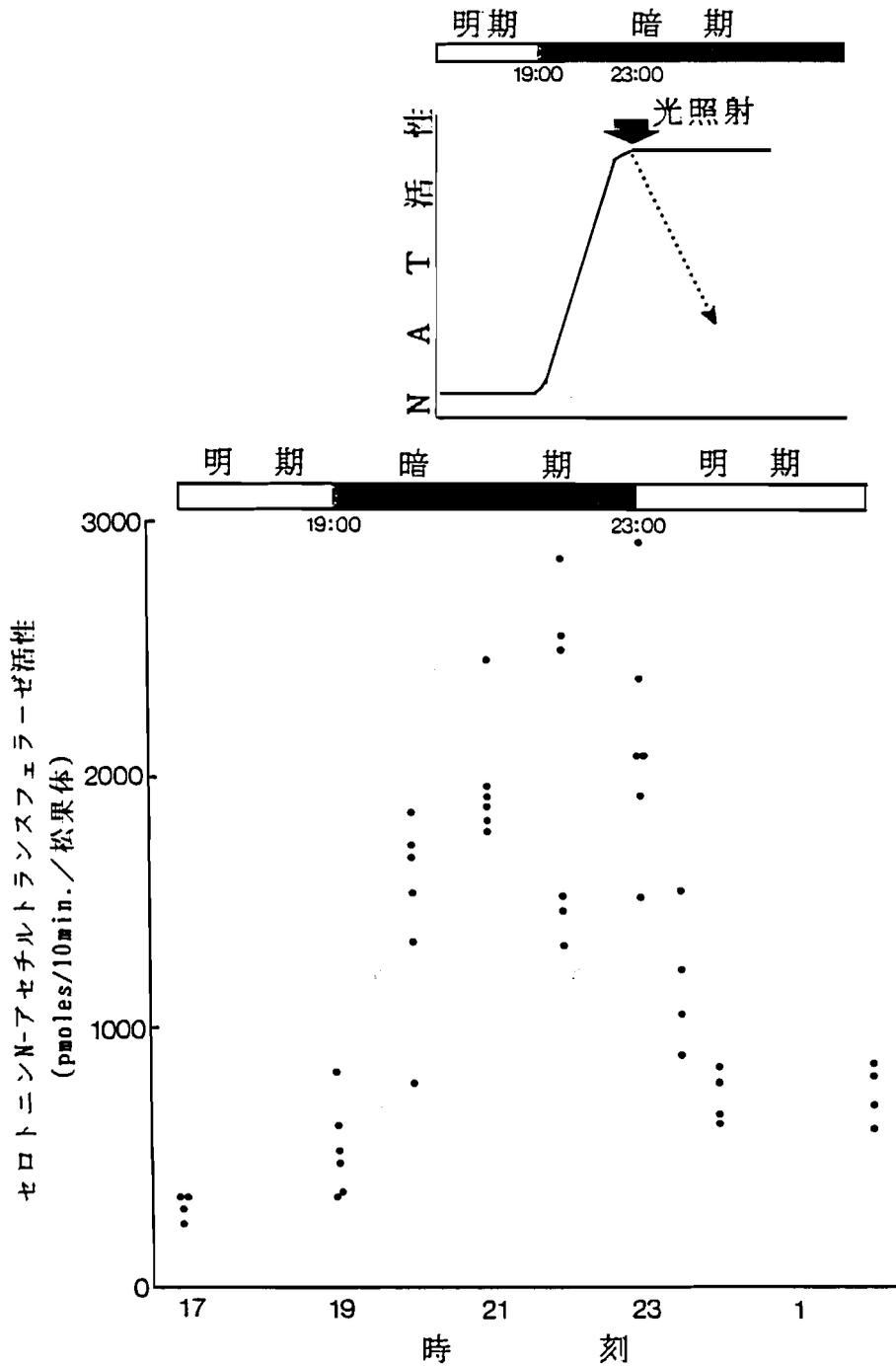


図 109 暗期に光照射 (23時点灯) した場合の、42日齢雄ニワトリひなの松果体 NAT 活性の変化。14時間照明10時間暗黒下で飼育したニワトリに光照射し、点灯時、点灯後30、60及び 180分後に NAT 活性を測定した。各点は、個々の松果体の NAT 活性をあらわす。

表 2 暗期に光照射（23時点灯）した場合の42日齢雄ニワトリひなにおける松果体 N A T 活性の変化

時 刻	N - アセチルトランスフェラーゼ 活性 (pmoles/10min./松果体)
17:00	302.8 ± 27.5 ¹⁾ (4) ²⁾ a ³⁾
19:00	525.8 ± 73.6 (6) a
20:00	1513.7 ± 160.5 (6) cd
21:00	1966.9 ± 100.3 (6) d
22:00	2036.5 ± 273.8 (6) d
23:00 (点灯直前)	2154.7 ± 196.1 (6) d
23:30 (点灯30分後)	1187.8 ± 140.6 (4) bc
24:00 (点灯60分後)	730.4 ± 53.1 (4) ab
2:00 (点灯180分後)	740.9 ± 56.2 (4) ab

- 1) 平均値 ± 標準誤差
- 2) 測定に用いた羽数
- 3) Newman-Keuls法⁶⁰⁾を用いて統計処理をした結果、符号が異なるものは、危険率5%で平均値間に有意差があることを示す。

3. 明期に暗黒処理をした場合の N A T 活性の変化

42日齢雄ひなを明期の10時に、完全な暗黒下においた場合の松果体 N A T 活性の変化を調べるための実験デザインと、その結果を図 110に、またそれらの数値を表 3 に示した。

暗黒開始直前の10時における N A T 活性値は、松果体 1 個あたり10分間インキュベーションを行って、平均 231.5 pmoles であった。その後の暗黒処理 2 時間及び 4 時間後の活性では、いずれも若干の上昇傾向がみられたが、統計的に有意（危険率 5 %）な差はなかった。

4. 連続照明に移行した場合の N A T 活性の変化

16日齢雄ひなを、照明終了予定時刻の19時以後も 200~300 lux. で照明を続け、合計 3 日間を明期とした場合の松果体 N A T 活性の変化を図 111 に、またそれらの数値を表 4 に示した。

連続照明 1 日目の 8 時から 19 時までの松果体 N A T 活性値は、14 時間照明 10 時間暗黒（対照区）下のものと同様低く維持されていたが、処理前の光周期（14 時間照明 10 時間暗黒）の消灯予定時刻であった 19 時から、さらに続けて照明すると、活性はゆるやかに上昇し始め、3 時には活性がピークに達し、統計的に有意（危険率 5 %）な増加を示した。その値は 8 時まで持続したが、その後は減少した。すなわち、連続照明 1 日目の N A T リズムは、活性が約 1/2 に抑制され、位相が約 3 時間後方に移動し、正常な暗期がない日周リズムを示した。

処理 2 日目の N A T 活性は、処理前の光周期の暗期予定時刻に相当する 24 時、3 時及び 5 時で上昇傾向を示し、位相が後方に大きくずれ、対照区とほぼ同じ活性値の顕著な自由継続リズムを示した。また、処理前の光周期の明期予定時間では、活性値は低い値を示していたが、全体的にみてわずかに上昇する傾向がみられた。

処理 3 日目の N A T 活性値は、個体によって大きな変動がみられたが、処理前の光周期の暗期予定時間では、しだいに上昇傾向が認められ

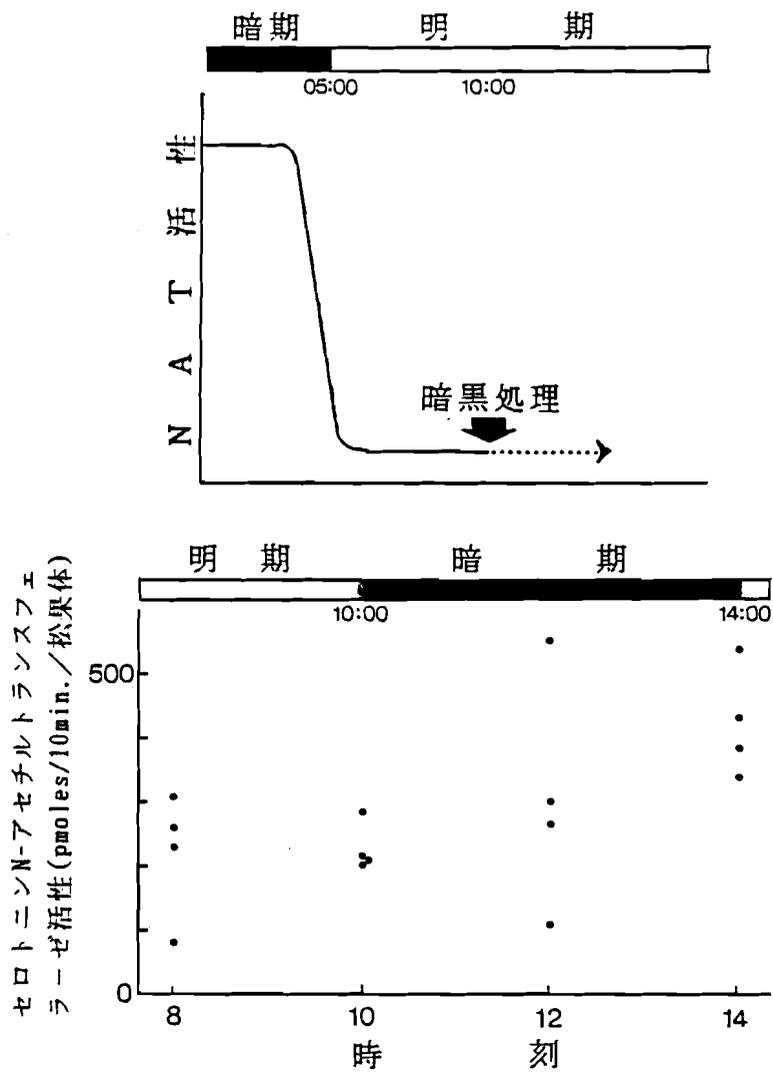


図 110 明期に暗黒処理（10時消灯）をした場合の、42日齢雄ニワトリひなにおける松果体NAT活性の変化。14時間照明10時間暗黒下で飼育したニワトリに暗黒処理をし、消灯直前、消灯後120及び240分後のNAT活性を測定した。各点は、個々の松果体のNAT活性をあらわす。

表 3 明期に暗黒処理（10時消灯）をした場合の42日齢雄ニワトリひなにおける松果体NAT活性の変化

時 刻	N-アセチルトランスフェラーゼ活性 (pmoles/10min./松果体)	
	暗黒処理区	対照区
8:00	219.3±48.9 ¹⁾ (4) ²⁾ a ³⁾	—————
10:00 (消灯直前)	231.5±18.0 (4) a	—————
12:00 (消灯 120分後)	305.9±94.2 (4) a	226.4±21.6 (4)
14:00 (消灯 240分後)	423.8±43.0 (4) a	262.2±29.5 (4)

- 1) 平均値±標準誤差
- 2) 測定に用いた羽数
- 3) Newman-Keuls法⁶⁰⁾を用いて統計処理をした結果、危険率5%で平均値間に有意差がなかった。

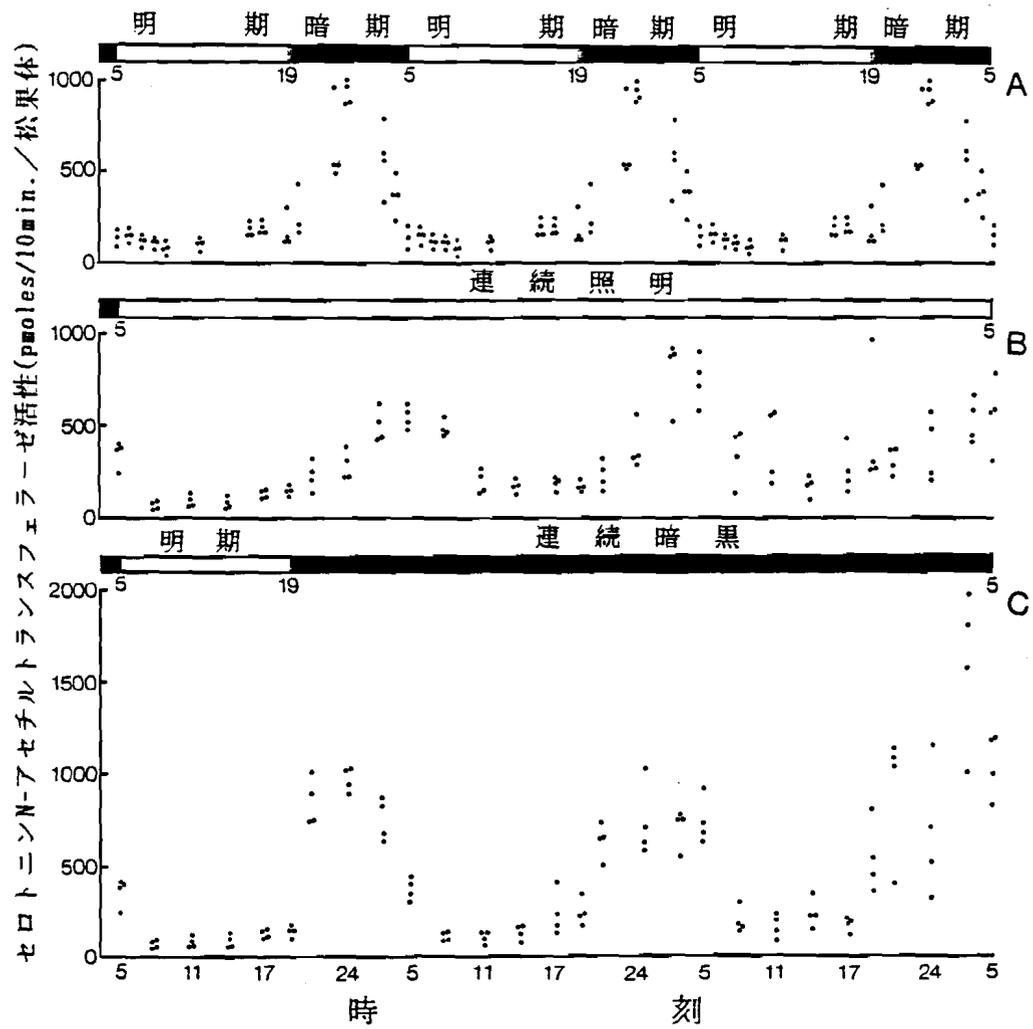


図 111 14時間照明10時間暗黒 (A), 連続照明 (B)及び連続暗黒 (C)の各光周期条件下で飼育した16日齢雄ニワトリひなの松果体NAT活性の変化。各点は、個々の松果体のNAT活性をあらわす。

表 4 16日齢雄ニワトリひなを連続照明下で飼育した場合の松果体
N A T活性の変化

時 刻		N-アセチルトラン スフェラーゼ活性 (pmoles/10min./ 松果体)	時 刻		N-アセチルトラン スフェラーゼ活性 (pmoles/10min./ 松果体)	
処 理 一 日 目	5:00	352.1 ± 35.3 ¹⁾ (4) ²⁾	処 理 二 日 目	19:00	176.1 ± 11.7 (4)	
	8:00	67.6 ± 8.9 (4)		21:00	229.9 ± 35.9 (4)	
	11:00	87.2 ± 7.9 (4)		24:00	372.5 ± 63.6 (4)	
	14:00	87.0 ± 12.8 (4)		3:00	821.5 ± 69.8 (4)	
	17:00	132.7 ± 4.7 (4)		処 理 三 日 目	5:00	742.4 ± 70.8 (4)
	19:00	144.7 ± 8.5 (4)			8:00	328.3 ± 72.7 (4)
	21:00	234.0 ± 35.7 (4)			11:00	376.9 ± 93.7 (4)
	24:00	288.6 ± 36.5 (4)			14:00	166.0 ± 28.7 (4)
3:00	494.2 ± 46.1 (4)	17:00	238.5 ± 59.2 (4)			
処 理 二 日 目	5:00	549.1 ± 20.6 (4)	19:00		439.5 ± 174.9 (4)	
	8:00	481.0 ± 21.4 (4)	21:00		298.1 ± 33.2 (4)	
	11:00	188.6 ± 31.0 (4)	24:00	362.5 ± 86.1 (4)		
	14:00	159.9 ± 19.3 (4)	3:00	521.0 ± 56.0 (4)		
	17:00	180.5 ± 10.9 (4)	5:00	548.2 ± 99.7 (4)		

1) 平均値 ± 標準誤差

2) 測定に用いた羽数

表 5 16日齡雄ニワトリひなを連続暗黒下で飼育した場合の松果体
N A T活性の変化

時 刻		N-アセチルトラン スフェラーゼ活性 (pmoles/10min./ 松果体)	時 刻		N-アセチルトラン スフェラーゼ活性 (pmoles/10min./ 松果体)
処 理 一 日 目	5:00	352.1±35.3 ¹⁾ (4) ²⁾	処 理 二 日 目	19:00	238.8±32.8 (4)
	8:00	67.6± 8.9 (4)		21:00	630.5±51.0 (4)
	11:00	87.2± 7.9 (4)		1:00	724.8±92.8 (4)
	14:00	87.0±12.8 (4)		3:00	692.2±47.4 (4)
	17:00	132.7± 4.7 (4)	処 理 三 日 目	5:00	727.6±64.6 (4)
	19:00	144.7± 8.5 (4)		8:00	178.7±36.8 (4)
	21:00	847.0±59.4 (4)		11:00	150.2±32.1 (4)
	24:00	984.2±41.8 (4)		14:00	225.4±34.8 (4)
	3:00	742.0±55.9 (4)		17:00	165.7±17.1 (4)
処 理 二 日 目	5:00	353.1±34.4 (4)	19:00	523.7±93.1 (4)	
	8:00	97.6±11.1 (4)	21:00	904.5±171.8 (4)	
	11:00	95.3±11.8 (4)	24:00	664.5±175.2 (4)	
	14:00	126.5±20.3 (4)	3:00	1586.9±214.2 (4)	
	17:00	232.0±56.9 (4)	5:00	1035.6±81.6 (4)	

1) 平均値±標準誤差

2) 測定に用いた羽数

た。

以上のように、ニワトリ松果体のNAT活性リズムは、連続照明処理を行うことによって、処理1日目の暗期の活性上昇が抑制された自由継続リズムへと変わったが、その後は対照区とほぼ同じ活性値を示す顕著な日周リズムを繰り返した。

5. 連続暗黒に移行した場合のNAT活性の変化

16日齢雄ひなを、点灯予定時刻の5時から完全な暗黒下に置いた松果体のNAT活性の変化を図111に、またそれらの数値を表5に示した。

処理1日目の5時（前光周期の点灯予定時刻）までは、対照区のものと同様に顕著な日周リズムを示した。

処理2日目の8時から19時までは、対照区と同じ低い活性値を維持したが、消灯予定時刻であった19時から、活性が急激に上昇し始め、その2時間後の21時には対照区と同様の高い活性値まで上昇し、その後も5時までその値を維持した。しかし、その後NAT活性は減少傾向を示し、8時には明らかに対照区の明期とほぼ同じ値まで低くなり、位相が後方に少しずれた顕著な自由継続リズムとなった。

処理3日目のNAT活性は、17時以降個体によって差がみられたが、全体的に上昇する傾向を示し、連続暗黒3日目でも所定のリズムを繰り返すものと思われた。

6. 24時間周期以外の光周期下においた場合のNAT活性の変化

ニワトリひなを、孵化直後から12時間照明12時間暗黒下であらかじめ飼育した後、16日齢から光周期を変更した場合、すなわち、3時間照明3時間暗黒、8時間照明8時間暗黒、または18時間照明18時間暗黒の光周期下においた場合と、これらの対照区として12時間照明12時間暗黒下の場合の松果体NAT活性の変化を比較し、その結果を図112に、またそれらの数値を表6、7及び8に示した。

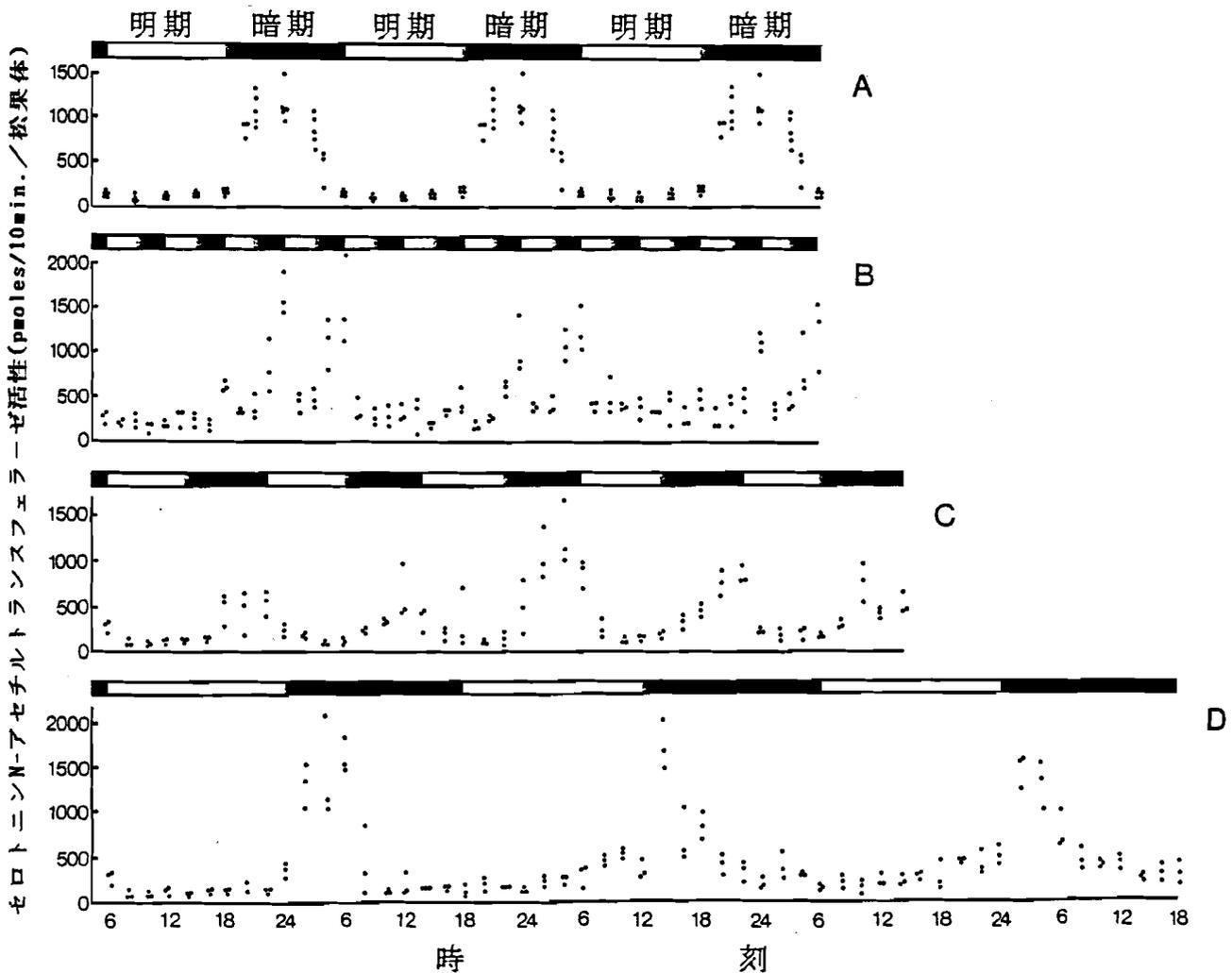


図 112 12時間照明12時間暗黒 (A), 3時間照明3時間暗黒 (B),
 8時間照明8時間暗黒 (C), 18時間照明18時間暗黒 (D)の各光周期条
 件下で飼育した13日齢雄ニワトリひなの松果体NAT活性の変化。各
 点は、個々の松果体のNAT活性をあらわす。

表 6 13日齢ニワトリひなを3時間照明3時間暗黒下で飼育した場合の松果体NAT活性の変化

時刻		N-アセチルトラン スフェラーゼ活性 (pmoles/10min./ 松果体)	時刻		N-アセチルトラン スフェラーゼ活性 (pmoles/10min./ 松果体)
第一 サイ クル	6:00	273.9±36.6 ¹⁾ (3) ²⁾	第七 サイ クル	19:30	159.7±24.7 (3)
	7:30	192.2±15.8 (3)		21:00	245.5±16.3 (3)
	9:00	220.4±45.0 (3)		22:30	571.8±42.9 (3)
	10:30	141.0±34.6 (3)		24:00	1019.5±179.0 (3)
	12:00	167.3±29.9 (3)		第八 サイ クル	1:30
第二 サイ クル	13:30	261.1±55.6 (3)	3:00		387.5±62.9 (3)
	15:00	227.7±36.0 (3)	4:30		1058.8±90.1 (3)
	16:30	163.7±20.8 (3)	6:00		1157.0±97.1 (3)
	18:00	613.3±27.5 (3)	第九 サイ クル	7:30	396.4±32.5 (3)
第三 サイ クル	19:30	309.7±5.4 (3)		9:00	471.0±126.3 (3)
	21:00	372.1±83.7 (3)		10:30	364.7±12.4 (3)
	22:30	817.3±168.7 (3)		12:00	327.9±56.8 (3)
	24:00	1631.6±128.3 (3)	第十 サイ クル	13:30	300.4±3.0 (3)
第四 サイ クル	1:30	440.8±53.7 (3)		15:00	387.0±112.6 (3)
	3:00	467.7±59.2 (3)		16:30	254.9±55.0 (3)
	4:30	1100.4±158.6 (3)		18:00	453.1±41.2 (3)
	6:00	1606.6±367.0 (3)	第十一 サイ クル	19:30	213.8±52.0 (3)
第五 サイ クル	7:30	358.0±62.2 (3)		21:00	352.9±99.5 (3)
	9:00	262.5±52.1 (3)		22:30	461.1±59.6 (3)
	10:30	277.6±68.6 (3)		24:00	1081.7±52.2 (3)
	12:00	314.5±47.5 (3)	第十二 サイ クル	1:30	324.4±41.8 (3)
第六 サイ クル	13:30	298.0±111.9 (3)		3:00	411.5±53.7 (3)
	15:00	197.1±35.8 (3)		4:30	753.7±131.7 (3)
	16:30	325.4±28.8 (3)		6:00	1189.1±215.4 (3)
	18:00	429.4±79.7 (3)			

1) 平均値±標準誤差

2) 測定に用いた羽数

表 7 13日齡ニワトリひなを8時間照明8時間暗黒下で飼育した場合の松果体NAT活性の変化

時 刻		N-アセチルトラン スフェラーゼ活性 (pmoles/10min./ 松果体)	時 刻		N-アセチルトラン スフェラーゼ活性 (pmoles/10min./ 松果体)
第 一 サ イ ク ル	6:00	273.9±36.6 ¹⁾ (3) ²⁾	第 三 サ イ ク ル	24:00	481.5±169.5 (3)
	8:00	70.5±27.7 (3)		2:00	1034.6±157.7 (3)
	10:00	30.9±11.4 (3)		4:00	1268.5±203.5 (3)
	12:00	90.9±25.1 (3)	第 四 サ イ ク ル	6:00	844.7±74.0 (3)
	14:00	101.8± 3.7 (3)		8:00	233.4±61.0 (3)
	16:00	134.6±14.1 (3)		10:00	102.7±15.2 (3)
	18:00	462.3±102.5 (3)		12:00	122.4±10.1 (3)
	20:00	432.7±133.8 (3)		14:00	156.3±21.5 (3)
	22:00	516.7±74.1 (3)		16:00	298.5±37.2 (3)
第 二 サ イ ク ル	24:00	205.0±38.8 (3)	第 五 サ イ ク ル	18:00	433.3±19.4 (3)
	2:00	147.0±14.6 (3)		20:00	736.3±86.1 (3)
	4:00	58.7± 8.3 (3)		22:00	816.7±47.4 (3)
	6:00	95.8±13.0 (3)		24:00	194.4± 5.3 (3)
	8:00	220.7±16.4 (3)		2:00	160.8±37.0 (3)
	10:00	327.4± 9.3 (3)		4:00	190.3±32.9 (3)
第 三 サ イ ク ル	12:00	612.2±175.1 (3)	6:00	127.3±10.1 (3)	
	14:00	353.8±80.8 (3)	8:00	281.1±23.2 (3)	
	16:00	173.0±28.2 (3)	10:00	739.4±127.4 (3)	
	18:00	303.6±204.5 (3)	12:00	404.0±12.0 (3)	
20:00	86.4±14.1 (3)	14:00	502.9±62.7 (3)		
22:00	129.7±35.6 (3)				

1) 平均値±標準誤差

2) 測定に用いた羽数

表 8 13日齡ニワトリひなを18時間照明18時間暗黒下で飼育した場合の松果体NAT活性の変化

時 刻		N-アセチルトラン スフェラーゼ活性 (pmoles/10min./ 松果体)	時 刻		N-アセチルトラン スフェラーゼ活性 (pmoles/10min./ 松果体)
第 一 サ イ ク ル	6:00	273.9±36.6 ¹⁾ (3) ²⁾	第 二 サ イ ク ル	14:00	1679.8±99.0 (3)
	8:00	70.5±27.7 (3)		16:00	647.9±144.3 (3)
	10:00	30.9±11.4 (3)		18:00	823.1±86.2 (3)
	12:00	90.9±25.1 (3)		20:00	382.7±61.8 (3)
	14:00	40.6±5.2 (3)		22:00	296.8±48.6 (3)
	16:00	100.7±16.3 (3)		24:00	184.9±35.3 (3)
	18:00	107.3±3.5 (3)	第 三 サ イ ク ル	2:00	382.1±82.9 (3)
	20:00	143.1±25.3 (3)		4:00	284.6±10.1 (3)
	22:00	105.2±13.7 (3)		6:00	151.7±19.3 (3)
	24:00	331.6±35.4 (3)		8:00	190.7±38.4 (3)
	2:00	1302.0±141.0 (3)		10:00	118.2±34.2 (3)
	4:00	1425.2±339.3 (3)		12:00	204.5±33.8 (3)
	6:00	1617.9±111.8 (3)		14:00	198.2±30.3 (3)
	8:00	399.8±217.7 (3)		16:00	238.6±17.4 (3)
	10:00	104.9±16.7 (3)		18:00	306.1±73.3 (3)
	12:00	181.5±70.0 (3)		20:00	278.0±9.7 (3)
	14:00	156.5±3.6 (3)		22:00	399.0±79.0 (3)
	16:00	138.6±3.8 (3)		24:00	491.7±60.5 (3)
18:00	82.1±40.2 (3)	2:00	1437.2±108.0 (3)		
20:00	187.6±36.1 (3)	4:00	1291.1±144.7 (3)		
22:00	145.0±4.0 (3)	6:00	752.8±127.0 (3)		
24:00	108.1±11.4 (3)	8:00	420.7±70.6 (3)		
2:00	213.1±25.1 (3)	10:00	373.1±31.0 (3)		
4:00	223.2±30.8 (3)	12:00	384.9±38.7 (3)		
6:00	283.9±83.2 (3)	14:00	235.9±19.7 (3)		
8:00	419.8±23.2 (3)	16:00	282.2±46.4 (3)		
10:00	501.4±15.1 (3)	18:00	270.3±74.6 (3)		
12:00	342.6±41.6 (3)				

1) 平均値±標準誤差

2) 測定に用いた羽数

12時間照明12時間暗黒下で飼育したニワトリひなの松果体のNAT活性は、14時間照明10時間暗黒下のものとほぼ同様の顕著な日周リズムを示した。

3時間照明3時間暗黒の光周期下では、以前の光周期の暗期に相当する時間帯に、3時間の暗黒処理を行った場合のみ、NAT活性は消灯後急激に上昇した。この場合、点灯直前に活性値は最高値に達したが、点灯後には、活性が常に抑制され低い値を維持した。一方、以前の光周期の明期に相当する時間帯に、3時間の照明または暗黒処理を繰り返しても、活性値はなんら変化せず、低い値を維持した。しかし、このような光周期を繰り返すと、個体によってしだいに活性値の差を生ずることが認められた。

8時間照明8時間暗黒の光周期下の第1サイクル及び第2サイクルでは、松果体NAT活性が消灯後ゆるやかに上昇し始め、4時間後には、対照区の暗期の活性値のほぼ1/2のレベルに達し、点灯後は抑制された。しかし、第3サイクルでは、活性は消灯後急激に上昇し、4時間後には、対照区とほぼ同様に顕著な日周リズムを示した。また、第4サイクル及び第5サイクルでは、活性が消灯後再びゆるやかに上昇し、第1サイクル及び第2サイクルと同様の変化を示した。

18時間照明18時間暗黒の光周期下の第1サイクルの明期では、松果体NAT活性は低い値を維持していたが、消灯後急激に上昇し、2時間後には、対照区と同様の高い値に達し4時間維持した。しかし、消灯8時間後には活性が明らかに減少し、その後明期と同様の低い値を保った。第2サイクル及び第3サイクルの明期では、NAT活性が時間の経過とともにゆるやかに上昇する傾向がみられ、消灯後急激に上昇し、2時間後には暗期の高い値に達した。しかし、NAT活性は直ちに急激に低下し、暗期の前半ですでに明期の低いレベルになった。

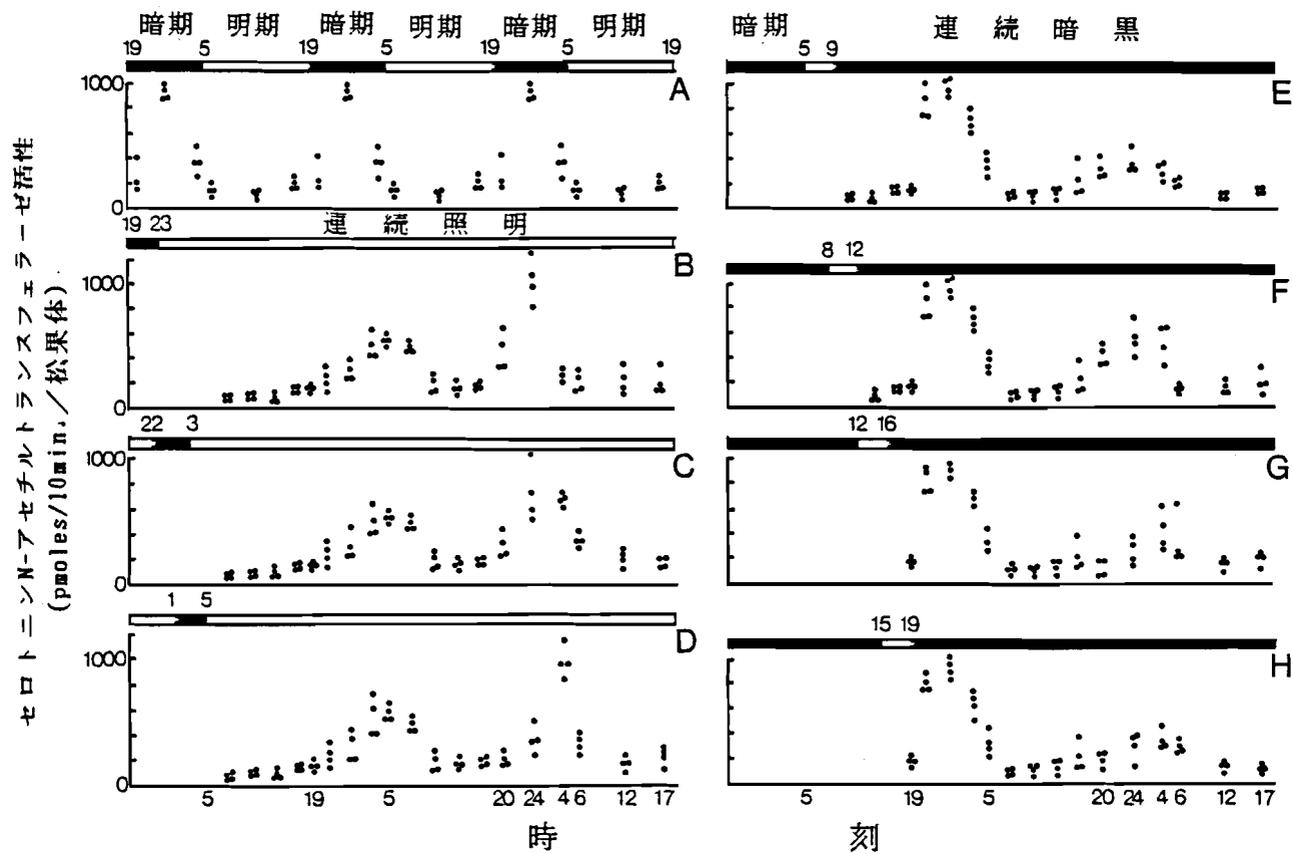


図 113 4～5時間の暗黒処理(B～D)及び4時間の暗黒処理(E～H)の時間帯の移動にともなう16日齢雄ニワトリひなの松果体NAT活性の変化。各点は、個々の松果体のNAT活性をあらわす。

表 9 4～5時間の暗黒処理及び4時間の照明処理の時間帯の移動にともなう16日齢雄ニワトリひなの松果体NAT活性の変化(処理2日目)

時刻	N-アセチルトランスフェラーゼ活性 (pmoles/10min./松果体)	
	14時間照明10時間暗黒 (対照区)	暗黒処理 (19～23時)
20:00	266.3±79.9 ¹⁾ (3) ²⁾ b ³⁾	454.7±74.1 (4) b
24:00	922.0±26.1 (4) d	1021.4±92.7 (4) c
4:00	372.6±49.4 (4) c	249.1±23.0 (3) a
6:00	148.1±18.0 (4) ab	209.3±34.1 (4) a
12:00	104.4±13.5 (4) a	219.5±46.0 (4) a
17:00	189.8±17.1 (4) ab	212.4±41.5 (4) a
時刻	暗黒処理 (22～3時)	暗黒処理 (1～5時)
20:00	312.3±49.1 (4) a	199.9±14.8 (4) ab
24:00	732.4±129.4 (4) b	355.2±54.0 (4) c
4:00	673.4±23.0 (4) b	990.4±64.2 (4) d
6:00	349.7±25.5 (4) a	338.2±29.5 (4) bc
12:00	201.4±26.7 (4) a	166.1±23.0 (4) a
17:00	177.9±16.0 (4) a	210.3±24.0 (4) ab
時刻	照明処理 (5～9時)	照明処理 (8～12時)
20:00	324.8±34.5 (4) b	421.2±39.1 (4) b
24:00	387.2±35.5 (4) b	557.0±63.2 (4) b
4:00	310.1±32.0 (4) b	531.9±66.4 (4) b
6:00	110.8±10.4 (4) a	162.8±11.1 (4) a
12:00	99.3±7.6 (4) a	165.6±19.9 (4) a
17:00	149.3±8.5 (4) a	201.3±44.2 (4) a
時刻	照明処理 (12～16時)	照明処理 (15～19時)
20:00	121.4±34.4 (4) a	202.4±27.8 (4) a
24:00	261.0±47.6 (4) ab	308.3±50.3 (4) b
4:00	426.0±73.1 (4) b	361.8±32.5 (4) b
6:00	327.6±103.4 (4) ab	304.2±21.3 (4) b
12:00	147.2±20.4 (4) a	124.4±14.0 (4) a
17:00	193.1±23.1 (4) ab	114.3±3.6 (4) a

1) 平均値±標準誤差

2) 測定に用いた羽数

3) Newman-Keuls法⁶⁰⁾を用いて統計処理をした結果、符号の異なるものは、危険率5%で平均値間に有意差があることを示す。

7. 短時間暗黒または照明処理の松果体 N A Tリズムへの影響

短時間暗黒または照明処理が、16日齢ニワトリひなの松果体の N A T 活性リズムに及ぼす影響を図 113 に、またその 2 日目の数値を表 9 に示した。

暗期予定時間の 10 時間のうち、4～5 時間のみ暗黒処理を行った後、光照射をしつづけても、松果体 N A T 活性はゆるやかに上昇し、通常の暗期の活性値の約 1/2 まで増し、位相が約 5 時間後方に遅れた日周リズムが認められた。19～23 時に暗黒処理をしたのち、照明を続けた場合 (図 113(B)) は、その後の消灯予定時刻 19 時以降で活性は急激に上昇し、14 時間照明 10 時間暗黒の日周リズム (図 113(A)) と同じ 24 時に高い活性値をもつ日周リズムが認められた。また、22～3 時に暗黒処理をした場合 (図 113(C)) は 24～4 時に、また 1～5 時に行った場合 (図 113(D)) は 4 時に、それぞれ最高値に達し、位相が後方に大きく移動した N A T リズムが認められた。

また、4 時間光照明を行い、その後は連続暗黒下に置くと、処理 1 日目では各区ともに、消灯予定時刻 19 時以後活性が急激に上昇し、自由継続リズムが認められた。処理 2 日目になると、短時間照明の時間帯の移動にともない、N A T リズムの位相が変化した。すなわち、15～19 時に光照明した場合 (図 113(H)) は、24～6 時に活性値が上昇し、対照区に比べて約 1/2 低い日周リズムを示した。しかし、5～9 時 (図 113(E))、8～12 時 (図 113(F)) または 12～16 時 (図 113(G)) に光照射を行って、消灯時刻を前方に移動させると、前 2 者は 20～4 時、また後者は 24～6 時に最高値に達し、位相が移動した N A T リズムが認められた。

8. 暗黒処理時間の長さが松果体 N A Tリズムに対する影響

前節において、消灯開始時刻 19 時から 4 時間暗黒処理をすると、松果体 N A T 活性の日周リズムは、連続照明下の活性値や N A T リズムの位相も、14 時間照明 10 時間暗黒下のものとほぼ同様であることを示した。

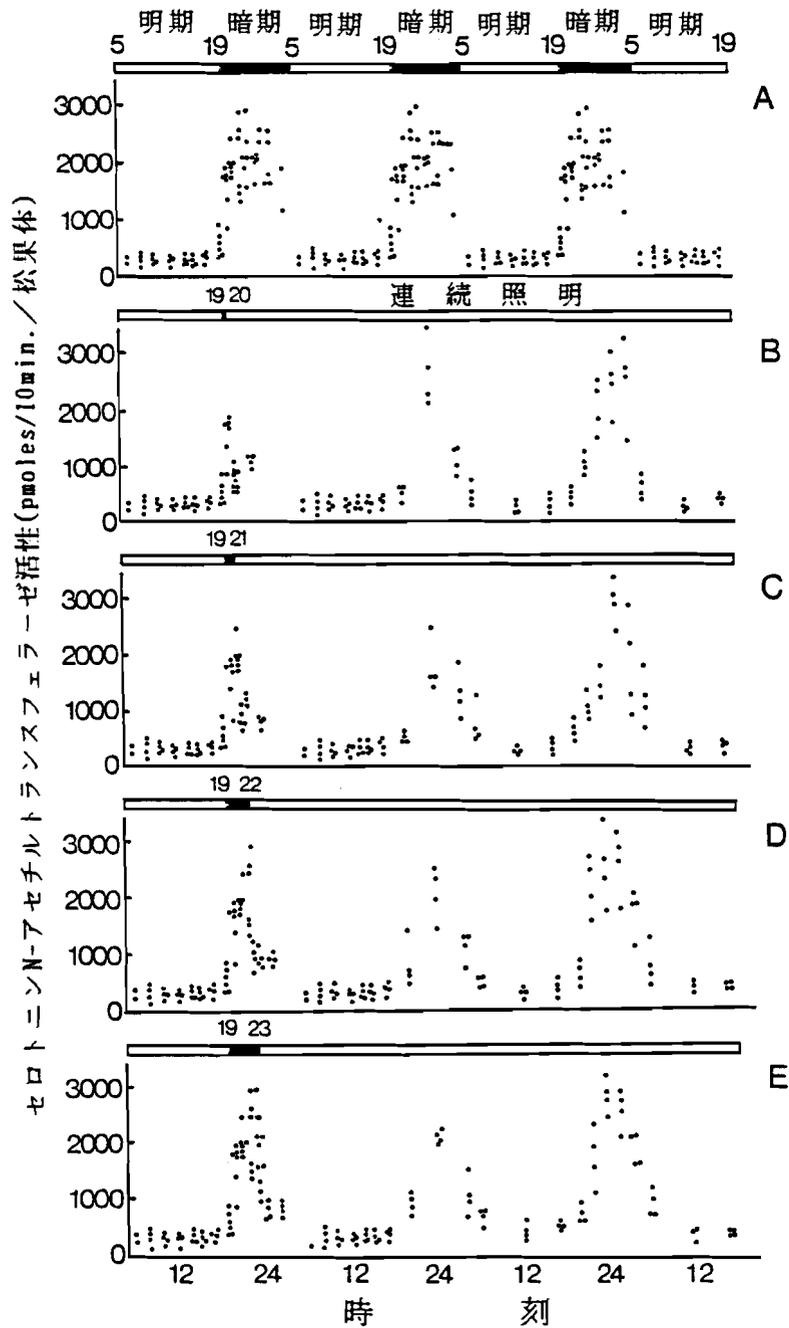


図 114 暗黒処理時間の長さによつて異なる42日齢雄ニワトリひなの松果体NAT活性の変化。全区19時に消灯し、それぞれ1, 2, 3及び4時間暗黒処理した後、連続照明条件下においた。各点は、個々の松果体のNAT活性をあらわす。

表 10 暗黒処理時間の長さにもなう42日齡雄ニワトリひなの松果体NAT活性の変化(処理1日目)

時刻	N-アセチルトランスフェラーゼ活性 (pmoles/10min./ 松果体)	
	14時間照明10時間暗黒 (対照区)	1時間暗黒処理 (19~20時)
20:00	1513.7±160.5 ¹⁾ (6) ²⁾ b ³⁾	509.6±60.1 (4) a
24:00	2062.5±24.0 (4) c	2637.5±299.5 (4) c
4:00	1489.3±394.8 (2) b	1120.3±125.4 (4) b
6:00	246.5±30.6 (2) a	472.9±89.1 (4) a
12:00	226.4±21.6 (4) a	209.1±30.0 (4) a
17:00	302.8±27.5 (4) a	303.5±56.7 (4) a
時刻	2時間暗黒処理 (19~21時)	3時間暗黒処理 (19~22時)
20:00	478.6±36.3 (4) a	777.9±206.0 (4) ab
24:00	1739.6±229.3 (4) c	2037.5±227.9 (4) c
4:00	1270.0±205.0 (4) b	1128.4±135.8 (4) b
6:00	699.4±184.1 (4) a	471.0±52.2 (4) a
12:00	174.3±18.2 (4) a	243.3±30.4 (4) a
17:00	275.3±60.3 (4) a	358.2±69.9 (4) a
時刻	4時間暗黒処理 (19~23時)	
20:00	890.2±70.0 (4) bc	
24:00	2078.8±38.2 (4) d	
4:00	1025.0±166.9 (4) c	
6:00	661.6±56.8 (4) ab	
12:00	387.0±80.3 (4) a	
17:00	497.6±30.9 (4) a	

- 1) 平均値±標準誤差
- 2) 測定に用いた羽数
- 3) Newman-Keuls法⁶⁰⁾を用いて統計処理をした結果、符号の異なるものは、危険率5%で平均値間に有意差があることを示す。

表 11 暗黒処理時間の長さにとりあう42日齢雄ニワトリひなの松果体NAT活性の変化(処理2日目)

時刻	N-アセチルトランスフェラーゼ活性 (pmoles/10min./ 松果体)	
	14時間照明10時間暗黒 (対照区)	1時間暗黒処理 (19~20時)
20:00	1513.7±160.5 ¹⁾ (6) ²⁾ b ³⁾	509.2±46.8 (4) ab
22:00	2036.5±273.8 (6) b	1023.8±76.0 (4) b
24:00	2062.5±24.0 (4) b	2039.6±247.4 (4) c
2:00	2073.8±229.4 (4) b	2479.3±262.1 (4) c
4:00	1489.3±394.8 (2) b	2521.6±385.6 (4) c
6:00	246.5±30.6 (2) a	615.6±68.0 (4) ab
12:00	226.4±21.6 (4) a	201.6±33.1 (4) a
17:00	302.8±27.5 (4) a	364.1±28.7 (4) ab
時刻	2時間暗黒処理 (19~21時)	3時間暗黒処理 (19~22時)
20:00	622.5±75.6 (4) ab	619.9±79.4 (4) a
22:00	1048.4±98.2 (4) bc	2195.8±258.2 (4) b
24:00	1442.0±140.0 (3) c	2492.2±340.4 (4) b
2:00	2914.6±219.1 (4) d	2596.0±287.3 (4) b
4:00	1791.7±441.5 (4) c	1702.1±211.6 (4) b
6:00	1170.9±226.1 (4) bc	753.3±183.4 (4) a
12:00	236.8±29.7 (4) a	352.9±25.2 (3) a
17:00	292.9±37.9 (4) a	323.7±27.9 (4) a
時刻	4時間暗黒処理 (19~23時)	
20:00	742.4±59.8 (4) a	
22:00	1719.7±249.4 (4) b	
24:00	2914.1±208.6 (4) c	
2:00	2740.9±232.7 (4) c	
4:00	1841.1±140.0 (4) b	
6:00	876.8±107.3 (4) a	
12:00	332.8±54.4 (3) a	
17:00	341.7±9.0 (4) a	

1) 平均値±標準誤差

2) 測定に用いた羽数

3) Newman-Keuls法⁶⁰⁾を用いて統計処理をした結果、符号の異なるものは、危険率5%で平均値間に有意差があることを示す。

そこで、この実験では、暗黒処理時間を4時間以内とし、その後2日間のNATリズムを調べた。その結果を図114に、またそれらの数値を表10と11に示した。

松果体のNAT活性は、消灯19時以後急激に上昇し始め、短時間暗黒後の点灯刺激により、全区とも抑制されたが、本来の明期の低いレベルまでは抑制されなかった。処理1日目では、全区ともに24時に最高値に達し、顕著なNATリズムが認められたが、処理2日目になると、暗黒処理時間が1時間(図114(B))、2時間(図114(C))、3時間(図114(D))及び4時間(図114(E))の場合は、各々24~4時、2時、22~2時及び24~2時において最高値に達し、暗黒処理の時間が短いほど、松果体NATリズムの位相は後方に移動する傾向があった。

考 察

本実験における16日齢及び42日齢のニワトリひなを、14時間照明10時間暗黒の光周期下においた場合、松果体のNAT酵素活性は顕著な日周リズムを示し、明期に低く暗期に高いリズムとなった。ラット²⁰⁾及びニワトリ²¹⁾の松果体では、明期に対する暗期のNAT活性比は、それぞれ約15倍及び27倍であると報告されているが、著者らの計測では約9倍と少し低かった。このように、本研究の酵素活性比が他の報告と異なった理由は、測定に用いた基質や緩衝液の種類と濃度、インキュベーション時間、及び松果体ホモゲネートの希釈倍率などの測定方法の違いによるためと思われる。また、ラットの松果体のNATリズムには、“lag phase”があり⁹²⁾、その間にNAT酵素蛋白の新生過程が進行することや、暗期の高活性は明期開始と同時に急激に減少することが特徴とされている⁹³⁾。それに対して、ニワトリ及びウズラの場合には、NAT活性が消灯直後ただちに上昇して高いレベルに達し、明期開始前にすでに減少していることから、哺乳類と鳥類との間でNAT活性の日周リズムに

大きな相違が認められた。これらのことから、鳥類の松果体は、単に外界の光に反応するばかりでなく、松果体自体にNATリズムを制御する生体時計機構が存在することが推察される。本研究では、ニワトリひな松果体のNAT活性の日周リズムが、明暗の異常変動に対していかに変化するかを調べたが、例えば、松果体のNAT活性が最高値に達する暗期に光照射した場合、ニワトリ松果体のNAT活性は、光照射1時間後に急激に減少したが、正常なリズムの明期にみられる低い値までは抑制されなかった。なお、ニワトリの松果体を生体から分離して、器官培養⁹⁴⁾または細胞培養⁹⁵⁾した後でも直接光照射すれば、NAT活性は完全に抑制されるといわれ、生体では特殊な制御機構があることがうかがわれた。一方、同じin vivoの実験をラットの松果体で行った場合には、活性が急激に減少し光照射10分後には完全に抑制され、最低の値になることが報告されている⁹⁶⁻⁹⁸⁾。さらに、この研究において、明期に暗黒処理をしたニワトリ松果体の場合、NAT活性は低いレベルを維持し、上昇傾向を示さなかった。筆者の他の研究によれば、ウズラでは暗黒処理3時間後でもNAT活性が低いレベルを維持し、また暗期にイソプロテレノールを投与しても上昇しないことが認められたが⁹⁹⁾、ラットを同じく明期に暗黒処理を行い、同時にカテコールアミンであるイソプロテレノールを投与すると、低下した活性が上昇することが知られている¹⁰⁰⁾。これらのことから、哺乳類の松果体のNATリズムは、交感神経によって支配されているが、鳥類の松果体のNATリズムには生体時計機構が存在していると考えられる。

ラット^{20,96)}及びニワトリ¹⁰¹⁾を連続照明すると、松果体のNATリズムは消失することが報告されている。本実験の結果、ニワトリの場合は処理1日目からNAT活性が約1/2に抑制された日周リズムを示し、2日目以後位相が後方に大きく移動し高い活性値をもつリズムが認められた。すなわち、連続照明の開始当初は、NAT活性が光照射によって抑制されたが、その後は、おそらく松果体のもつ生体時計機構により、し

だいにメラトニン生合成リズムを回復したものと推察される。なお、ニワトリには 200 lux. 以上の照明を行ったので、照度が低いために連続照明下での N A T リズムが出現したのかもしれない。

ニワトリひなを連続暗黒においた場合、松果体の N A T リズムは少なくとも 3 日間存続し、その位相が後方に移動した概日リズムを示した。Binkley and Geller¹⁰²⁾は、ニワトリ松果体の N A T 活性が、処理 1 日目の値よりも低い日周リズムを示すと報告したが、筆者の結果は、この報告と一致しなかった。

Binkley ら^{103,104)}は、ニワトリを用い、孵化日から 24 時間の光周期下で暗期の長さを種々変更した場合の松果体 N A T 活性の日周リズムを検討し、一光周期の暗期を長くすると、松果体の N A T 総活性値は上昇するが、平均活性値は低くなり、また松果体の光に対する感受性は、暗期後半に低下することを明らかにした。そこで、12 時間照明 12 時間暗黒を対照区し、24 時間周期を 4 分割した 3 時間照明 3 時間暗黒、48 時間周期を 3 分割した 8 時間照明 8 時間暗黒、及び 36 時間周期に延長した 18 時間照明 18 時間暗黒のそれぞれの光周期に対する松果体 N A T 活性の変動を調べた。

3 時間照明 3 時間暗黒下では、その暗黒時間が実験前の周期の暗期時間帯に相当する時、N A T 活性は上昇してピークに達するが、明期時間帯に相当する時は常に低い値を示した。また、暗期で活性がピークに達した後に光照射をすると、活性が急激に減少し、明期には常に低い値を示した。これらのことから、3 時間照明 3 時間暗黒下でも、以前の明暗条件（12 時間照明 12 時間暗黒）の影響をうけて概日リズムをくりかえしており、6 時間周期の光周期には同調しないことが明らかとなった。

8 時間照明 8 時間暗黒下の第 1、第 2、第 4 及び第 5 サイクルでは、N A T 活性は消灯後ゆるやかに上昇するが、高い活性値を示さず、第 3 サイクルのみ急激に活性が上昇し、消灯 4 時間後にピークに達するリズムを示した。その理由として、第 3 サイクルの消灯刺激が処理前の明暗

条件の暗黒時間帯に相当したことが主たる要因と思われた。しかしその後は、8時間照明8時間暗黒の光周期条件をくりかえすことによって、しだいにNATリズムが同調する傾向が認められた。

18時間照明18時間暗黒下の第1サイクルでは、消灯後急激にNAT活性が上昇し、比較的長く高い活性値を維持し、消灯10時間後には明期と同様な低い値を示した。しかし、第2及び第3サイクルでは、すでに点灯12時間後の明期からNAT活性が上昇傾向を示し、消灯後急激に活性が上昇したが、消灯6時間後で明らかに減少傾向を示していた。この第1サイクルのNATリズムは、以前の明暗条件（12時間照明12時間暗黒）の日周リズムを、光照射によって位相を後退させた結果、出現したものである。しかし、第2及び第3サイクルでは、NATリズムが新しい光周期条件下で同調しようとする傾向がみられたが、困難であるように思われた。これらのことから、ニワトリの松果体内に存在する概日オシレーターによって、NATリズムを修正しているものと推察される。

以上の結果から、点灯刺激はNAT活性を減少させる効果をもつが、活性の上昇あるいはNATリズムの発現には消灯刺激が重要な役目をしているものと思われた。

次に、通常の光周期下にあったニワトリひなを連続照明処理すると、処理1日目の松果体NAT活性は、約1/2に抑制された低い日周リズムを示すが、2日目以後では、位相が後方に移動し高い活性値をもった日周リズムが認められた。この実験で4～5時間の暗黒処理を行った後に連続照明処理をすると、処理1日目では光照射により抑制された日周リズムを示した。しかし、暗黒処理を行う時間を3時間または6時間遅らせると、処理2日目のNATリズムのピークがそれぞれおよそ2時間または4時間遅れ、位相が後退した。また、暗黒処理を19～23時に行った場合の処理2日目のNATリズムと、通常の14時間照明10時間暗黒下のNATリズムがほぼ一致していることより、主に消灯刺激が信号となっ

て、N A Tリズムの位相を定めて同調させているものと考えられる。なお、消灯刺激を遅らせた時間と、松果体のN A Tリズムが位相後退した時間とが一致していないのは、松果体自体が生体時計機構を有し、N A Tリズムの位相を修正しているためと思われる。

さらにニワトリひなに短時間照明処理をし、その後連続暗黒処理を行うと、処理2日目の松果体N A T活性は処理1日目のものよりも約1/2低いことが認められ、Binkley and Geller¹⁰²⁾の知見と一致した。なお、処理2日目のN A Tリズムのピークは、5～9時、または8～12時に光照射した場合は20～4時に、そして12～16時または15～19時に処理した場合は、24～6時に存在した。なお、12～16時または15～19時に光照射した場合のピークは、連続暗黒処理2日目のもの(24～5時)とほぼ一致したことから、消灯刺激の時間を早めると、N A Tリズムの位相が前進することが認められ、短時間暗黒処理の場合と同様、主に消灯刺激が信号となってN A Tリズムの位相を定めているものと考えられる。さらに、消灯時刻を19時に定め、4時間以下の暗黒処理の長さでの松果体N A T活性のリズムの位相変化をみると、処理1日目の松果体N A Tリズムは、全区ともほぼ同様となったが、2日目では、暗黒処理時間が1～2時間と短い場合は暗黒処理の効果が薄れ、連続照明処理の影響により位相が後退した。これらのことより、ニワトリ松果体のN A Tリズムが明暗光周期に同調するためには、少なくとも暗期の長さが3時間必要であると考えられた。さらに、同じ19時から4時間暗黒処理を行った場合、16日齢個体のN A Tリズムは、対照区よりも位相が約5時間後方に移動し、活性が抑制されたが、42日齢のものでは対照区とほぼ同じ活性値のリズムを示しており、光によるN A T活性の抑制効果は日齢を経るにともなって弱まり、ニワトリ松果体の光受容機能がしだいに低下することが推察された。

要 約

この研究ではニワトリひなを用い、種々の光周期変更を与えた場合の松果体セロトニン N -アセチルトランスフェラーゼ (NAT) 活性の変化を究明し、鳥類の松果体機能と明暗光周期との関係を明らかにしようとした。

14時間照明10時間暗黒(5時点灯19時消灯)、または12時間照明12時間暗黒(6時点灯18時消灯)の光周期下で飼育した13~42日齢雄ニワトリを用い、人為的に設定した各実験条件に従い光周期を変更した。NAT活性の測定のためには、基質として2 mM 5-メソキシトリプタミン、補酵素として2 mM アセチル- ^{14}C CoAを加えて反応液とし、松果体を反応液で均質化したのち、40°Cで10分間インキュベートし、トルエン/イソアミルアルコール混合液でメラトニン- ^{14}C を抽出後、その上清の放射能を測定し、NAT活性を算出した。

その結果、ニワトリひなの松果体のNAT活性は、明期では抑制されるが、消灯とともに急激に上昇し、3~4時間後には暗期の高い値に達した。その後は急激に減少し、点灯時にはすでに明期の低い活性値となった。なお、暗期に光照射を行うと、松果体のNAT活性は急激に抑制されたが、明期に暗黒処理を行っても急激に上昇しなかった。ニワトリひなを周期の途中から連続照明下におくと、松果体のNAT活性は、処理1日目で暗期の上昇予定が抑制され、その後対照区とほぼ同じ活性値の日周リズムを繰り返した。次に3時間照明3時間暗黒周期におくと、松果体は12時間照明12時間暗黒のリズムに従った。また8時間照明8時間暗黒では、一応新しいリズムに従う傾向を示した。さらに、18時間照明18時間暗黒では、暗期の上昇は極めて早く、暗期中の低下も早くなった。また、ニワトリひなに、暗期を4~5時間に短縮したのち連続照明しつづけると、処理1日目のNAT活性は約1/2に低くなり、ピークが約5時間後方に移動した日周リズムがあらわれた。2日目のNAT

リズムは、19～23時に暗黒処理した場合、対照区と一致していたが、22～3時または1～5時と遅らせると、およそ2時間または4時間それぞれ位相が後退した。また、明期（5～19時）の14時間のうち、5～9時、8～12時、12～16時または15～19時に光照射した後連続暗黒下におくと、処理2日目の松果体NAT活性は約1/2低いリズムを示したが、消灯時刻にしたがってNATリズムが同調していた。これらのことより、ニワトリ松果体のNATリズムの位相は、明暗光周期の消灯刺激が主な信号となって決定されているものと思われた。なお、19時に消灯し、暗黒時間の長さを4時間以内にした場合の松果体NAT活性のリズムは、暗黒処理時間が3時間以上あれば光周期に同調するが、1～2時間では効果がないことが確かめられた。

第Ⅵ章 総括

松果体は、系統発生学的に光受容器官から内分泌器官へと大きく変遷した器官である。鳥類の松果体は、進化の中間段階に位置して、光を直接感受して生体時計機構を有するとともに、ホルモンとしてメラトニンを生合成することが報告されている。しかし、その詳細はいまだ明らかでない。この研究では、ニワトリ松果体について、主に光周期に対する組織学的変化を検索するとともに、さらに種々の光周期に対するメラトニン生合成能の変化を生理化学的に検討し、松果体機能と光との関係を明らかにしようとした。

まず、ニワトリの松果体の組織発生について検討した。松果体原基は、孵卵3日目に間脳蓋板の一部が膨出し、その上衣細胞が分化増殖して、柱状細胞が放射状に配列し、いわゆるロゼットや小胞構造を形成するが、孵卵12日目頃より小胞の周囲には不定形細胞が不規則に並んだ傍小胞域が出現した。この時期の小胞細胞は、その形態から機能的に光受容に関係すると思われたが、さらに、細胞内の微細顆粒の動行から分泌機能をも有することが察知された。しかし、孵化日が近づくにつれて、小胞構造は崩れて小型化し、傍小胞域が拡大するとともに実質が緻密となり、孵化後は次第に小葉構造を呈するようになった。さらに、実質内への交感神経の侵入やリンパ小節の発達などが進行して、小胞構造が崩壊し、松果体組織はやがて緻密な腺小葉構造となった。また、それらの松果体組織について酵素分布を検索すると、酸性ホスファターゼは孵卵6日目より、アルカリ性ホスファターゼ、モノアミン酸化酵素及びコハク酸脱水素酵素は孵卵10日目より実質細胞で検出される様になり、各酵素活性ともしだいに上昇した。

次に、ニワトリの松果体組織のなかで、光受容機能に関係していると思われる小胞構造について、その形態学的特性を詳細に検討した。すなわち、孵化前後の松果体では小胞を構成している柱状細胞が松果体細胞と支持細胞の2種類に区別されるとともに、酸性ホスファターゼ、アルカリ性ホスファターゼ、モノアミン酸化酵素及びコハク酸脱水素酵素の

酵素活性が検出され、これらの松果体細胞は、機能的に光受容するとともに、腺細胞機能を備えた受容分泌細胞であることが察知された。

また、松果体細胞と光周期との関係を確認するため、孵卵期間中に連続暗黒下においたニワトリ胚子の松果体組織は、極めて順調に発達したのに比べて、孵卵8日目より連続照明を行ったものでは小胞形成が抑制され遅延し、明らかに細胞が萎縮し、染色顆粒が減少していた。さらに、通常の明暗光周期下における松果体の組織変化をみると、特に大型の小胞の松果体細胞が明期後半から拡大し、暗期後半で最小となるとともに、それらの核は、暗期が近づくにつれて大型化し、やがて最大となった。また、酵素組織化学的には暗期に酵素活性が高く、特に傍小胞域で上昇する傾向が認められた。

一方、ニワトリ松果体の内分泌機能に及ぼす光周期または生体時計機構の影響を確認するため、松果体のメラトニン生合成のキーエンザイムであるセロトニンN-アセチルトランスフェラーゼ(NAT)活性を調べた結果、明期に低く暗期に高い顕著な日リズムが認められ、光照射はNAT活性を強く抑制し、一時的に低下させた。すなわち、松果体のホルモン生産は明らかに光の影響を受けるものと思われたが、日齢を経るにともないこの抑制効果はしだいに弱まった。さらに、連続暗黒及び連続照明処理下のNATリズムは、明暗刺激がなくとも位相が後方にずれた自由継続リズムを示すほか、極端に短い光周期には同調することができないなどから、松果体内に対する生体時計機構の関与が察知された。これらの研究の結果、ニワトリの松果体は、発生の早期には、小胞の松果体細胞において光を直接感受する光受容機能と、光刺激で制御される分泌機能を有するが、その後は、小胞の崩壊によって次第に光受容機能を失い、生体時計にもとづくメラトニンの生合成によって、概日リズムの発現に関与するものと考えられた。

謝 辞

本研究の遂行に際し、多大なる御指導を賜わり、かつ本論文の作成にあたりいろいろと御助言下さいました苅田 淳教授に深く謝意を表します。本実験に際し御助言及び御協力いただきました加藤征史郎助教授並びに河南保幸助手に感謝いたします。また、研究の遂行に当り、いろいろと御助言下さいました福島豊一教授並びに木村 重教授に感謝いたします。

文 献

- 1) 和氣健二郎 松果体 - 光受容器官から内分泌器官へ - . ホルモンと適応 (小林英司・和田 勝編), pp 47~62, 日本学会出版センター (1981).
- 2) Oksche, A. Structural organization of avian neuroendocrine systems. In *Biological Rhythms in Birds : Neural and Endocrine Aspects* (Tanabe, Y., K. Tanaka and T. Ookawa, eds.), pp 3~15, Japan Sci. Soc. Press, Tokyo/Springer-Verlag, Berlin (1980).
- 3) Kelly, D.C. Pineal organs : photoreception secretion, and development. *Amer. Sci.*, 50: 597~625 (1962).
- 4) Eakin, R.M. A third eye. *Amer. Sci.*, 58: 73~79 (1970).
- 5) Takahashi, H. Light and electrone microscopic studies on the pineal organ of the goldfish, Carassius auratus L. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*, 20: 143~157 (1969).
- 6) 和氣健二郎 松果体の形態学, *脳神経*, 32: 655~667 (1980).
- 7) Oksche, A. und H. Kirschstein Unterschiedlicher Electronenmikroskopischer Feinbau der Sinneszellen im Parietalauge und im Pinealorgan (Epiphysis cerebri) der Lacertilia. Ein Beitrag zum Epiphysenproblem. *Z. Zellforsch.*, 87: 159~192 (1968).
- 8) Steyn, W. Electron microscopic observations on the epiphysial sensory cells in lizards and the pineal sensory cell problems. *Z. Zellforsch.*, 51: 735~747 (1960).
- 9) Kappers, J.A. Survey of the innervation of the epiphysis cerebri and the accessory pineal organs of the vertebrates. In *Structure and Function of the Epiphysis Cerebri* (Prog.

- Brain Res., Vol. 10, Kappers, J.A. and J.P. Schadé, eds), pp 87 ~ 153, Elsevier Amsterdam (1965).
- 10) Quay, W.B., J.A. Kappers and J.F. Jongkind Innervation and fluorescence histochemistry of monoamines in the pineal organ of a snake (Natrix natrix). J. Neuro-Visceral Relations, 31: 11~25 (1963).
 - 11) 和氣健二郎 松果体 - その系統発生学的考察 . 神経進歩 , 23: 762 ~ 772 (1979).
 - 12) Hartwig, H-G. The structure of the pineal gland. In Avian Endocrinology (Epple, A. and M.H. Stetson, eds.), pp 33-51, Academic Press, New York (1980).
 - 13) Oksche, A., Y. Morita und M.V-. von Harnack Zur Feinstruktur und Funktion des Pinealorgans der Taube (Columba livia). Z. Zellforsch., 102: 1~30 (1969).
 - 14) Boya, J. and J. Calvo Post-hatching evolution of the pineal gland of the chicken. Acta anat., 101: 1~9 (1978).
 - 15) Boya, J. and J. Calvo Evolution of the pineal gland in the adult chicken. Acta anat., 104: 104~122 (1979).
 - 16) Didio, L.J.A., D.J. Allen, L.L. Litke and R.A. Yeasting Light and electrone microscopic study of the pineal gland in five-day-old chickens. J. Submicr. Cytol., 10: 265~279 (1978).
 - 17) Omura, Y. Ultrastructural study of embryonic and post-hatching development in the pineal organ of the chicken. Cell Tissue Res., 183: 255~271 (1977).
 - 18) Fujie, E. Ultrastructure of the pineal body of the domestic chicken with special reference to the changes induced by altured photoperiods. Arch. histol. Jap., 29:

271 ~ 303 (1968).

- 19) Sato, T. and K. Wake Organizations of the sensory and sympathetic nerves in the avian pineal organs. *Jikeikai Med. J.*, 28(Suppl. 1): 7~12 (1981).
- 20) Klein, D.C. and J.L. Weller Indole metabolism in the pineal gland : a circadian rhythm in N-acetyltransferase. *Science*, 169: 1093~1095 (1970).
- 21) Binkley, S., S.E. MacBride, D.C. Klein and C.L. Ralph Pineal enzymes : regulation of avian melatonin synthesis. *Science*, 181: 272~275 (1973).
- 22) 出口武夫 鳥の松果体の生体時計機能 . 科学 , 50: 89~97 (1980).
- 23) Watts, R.H., D. Green and G.R. Howells Improvement in histological techniques for epoxyresin embedded bone specimens. *Stain Technol.*, 56: 155~161 (1981).
- 24) Hotschkiss, R.D. A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structure in fixed tissue preparations. *Arch. biochem.*, 16: 131~141 (1948).
- 25) Barka, T. and P.J. Anderson Histochemical methods for acid phosphate using hemazonium pararosanilin as coupler. *J. Histochem. Cytochem.*, 10: 741~753 (1962).
- 26) Burstone, M.S. Histochemical comparison of naphthol AS-phosphates for the demonstration of phosphatases. *J. Natl. Cancer Inst.*, 20: 601~615 (1958).
- 27) Glenner, G.G., H.J. Burtner and G.W. Brown, Jr. The histochemical demonstration of monoamine oxidase activity by tetrazolium salts. *J. Histochem. Cytochem.*, 5: 591~600 (1957).

- 28) Nachlas, M.M., K-C. Tsou, E.D. Souza, C-S. Cheng and A.M. Seligman Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenyl substituted ditetrazole. *J. Histochem. Cytochem.*, 5: 420~436 (1957).
- 29) Spiroff, B.E.N. Embryonic and post-hatching development of the pineal body of the domestic fowl. *Amer. J. Anat.*, 103: 375~401 (1958).
- 30) 見上晋一・加藤嘉太郎 鶏の松果体の研究. 第1報 鶏の松果体の形態発生学的研究 - 特に他綱の動物との比較 - . 日畜会報, 19: 35~38 (1949).
- 31) Calvo, J. and J. Boya Embryonic development of the pineal gland of the chicken (Gallus gallus). *Acta anat.*, 101: 289 ~ 303 (1978).
- 32) 西山文朗・見上晋一 鶏の松果体の細胞分化. 岩手大学農学部報告, 12: 107~131 (1974).
- 33) Renzoni, A. Development morphology of the pineal complex in doves and pigeons. *Z. Zellforsch.*, 104: 19~28 (1970).
- 34) Bischoff, M.B. Photoreceptor and secretory structure in the avian pineal organ. *J. Ultrastruct. Res.*, 28: 16~26 (1969).
- 35) Oksche, A. und M.V-. von Harnack Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Frage der Sinneszellen im Piealorgan der Vögel. *Z. Zellforsch.*, 69: 41~60 (1966).
- 36) Romiou, M. and G. Jullien Évolution et valeur morphologique der vésicules closes de la glande pineale des Oiseaux. *C. R. Soc. Biol.*, 136: 630~632 (1942).
- 37) 大島浩二・松尾信一 幼若鶏の松果体の微細構造. 特に明暗光周期との関連性について. 信州大学農学部紀要, 16: 61~77

(1979).

- 18) Wight, P.A.L. and G.M. MacKenzie The histochemistry of the pineal gland of the domestic fowl. *J. Anat.*, 108: 261 ~ 273 (1971).
- 39) Tanabe, Y., O. Doi and T. Nakamura Ontogenesis and photoperiodic regulation of the pineal hormone synthesis in the chicken (Gallus domesticus). In *Avian Endocrinology: Environmental and Ecological Perspectives*. (Mikami, S., K. Homma and M. Wada, eds.), pp 217~227, Japan Sci. Soc. Press, Tokyo/Springer-Verlag, Berlin (1983).
- 40) Wisloki, G.B. and E.W. Dempsey The chemical histology and cytology of the pineal body and neuro-hypophysis. *Endocrinology*, 42: 56~72 (1948).
- 41) Mikami, S. Cytological and histochemical studies of the pineal bodies of domestic animals. *Tohoku J. Agri. Res.*, 2: 41 ~ 48 (1951).
- 42) Bostelmann, W. und A. Bieningraber Enzymhistochemie der Epiphysis cerebri des Kaninchens. *Acta Neuropathol.*, 2: 461 ~ 469 (1963).
- 43) Charlton, H.M. The pineal gland of *Xenopus leavis*, daudin: a histological, histochemical, and electron microscopic study. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 11: 465~480 (1968).
- 44) Binkley, S. and E.B. Geller Pineal enzymes in chickens : development of daily rhythmicity. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 27: 424 ~ 429 (1975).
- 45) Ohshima, K. and S. Matsuo Functional morphology of the pineal gland in young chickens. *Anat. Anz.*, 156: 407~418 (1984).

- 46) Calvo, J. and J. Boya Development of the innervation in the chicken pineal gland (Gallus gallus). Acta anat., 103: 212 ~ 225 (1979).
- 47) Gomori, G. Observations with differential stains on human islets of langerhans. Am. J. Pathol., 17: 395~409 (1941).
- 48) Gomori, G. Aldehyde-fuchsin: a new stain for elastic tissue. Amer. J. Clin. Pathol., 20: 665~666 (1950).
- 49) 佐野 豊 組織学研究法, 南山堂, 東京 (1975).
- 50) Sandborn, E.B. In Cells and Tissues by Light and Electron Microscopy. Academic Press, New York (1970).
- 51) 矢内原 昇・小林 繁 内分泌器官形態学実験法, 講談社, 東京 (1982).
- 52) Baker, J.R. The histochemical recognition of lipine. Quart. J. Micro. Sci., 87: 441~471 (1946).
- 53) Goldner, J. A modification of the Masson trichrome technique for routine laboratory purposes. Am. J. Pathol., 14 : 237~243 (1938).
- 54) 堀 嘉昭 電子顕微鏡試料技術集, 日本電子顕微鏡学会関東支部編, pp 352, 誠文堂新光社, 東京 (1970).
- 55) Rüdénberg, C. A rapid method for staining thin sections of Vestopal W-embedded tissue for light microscopy. Experientia, 23: 792 (1967).
- 56) Rappaport, B.Z. Atopic dermatitis. II. Melanin distribution and dihydroxyphenylalanine oxidase reaction. Arch. Pathol., 61: 318~321 (1956).
- 57) Gomori, G. Microtechnical demonstration of sites of lipase activity. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 58: 362~364 (1945).

- 58) Wight, P.A.L. Development of the sympathetic innervation of the pineal of the domestic fowl. Acta morph.-scand., 9 : 47~56 (1971).
- 59) Rudolph, G. and H.J. Klein Histochemische Darstellung und Verteilung der Glucose-6-phosphat-dehydrogenase in normalen Rattenorganen. Histochemie, 4: 238~251 (1964).
- 60) Snedecor, G.W. and W.E. Cochran In Statistical Method, 6th ed., Iowa Univ. Press, Ames. (1967).
- 61) Siegel, P.B., S.T. Isakson, F.N. Coleman and B.J. Huffman Photoacceleration of development in chick embryos. Comp. Biochem. Physiol., 28: 753~758 (1969).
- 62) Tamimie, H.S. and M.W. Fox Effect of continuous and intermittent light exposure on the embryonic development of chicken eggs. Comp. Biochem. Physiol., 20: 793~799 (1967).
- 63) Romanoff, A.L., L.L. Smith and R.A. Sullivan Biochemistry and biophysics of the developing hen's egg. 3. Influence of temperature. Cornell Univ. Agri. Expt. Sta. Men., 216: 1 ~ 42 (1938).
- 64) Krabbe, K.H. Development of the pineal organ and a rudimentary parietal eye in some birds. J. Comp. Neurol., 103: 139~149 (1955).
- 65) Semm, P. and C. Demaine Electrical responses to direct and indirect photic stimulation of the pineal gland in the pigeon. J. Neural Transm., 58: 281~289 (1983).
- 66) Quay, W.B. Cytological and metabolic parameters of pineal inhibition by continuous light in the rat (Rattus norvegicus). Z. Zellforsch., 60: 479~490 (1963).

- 67) Kachi, T., S. Matsushima and T. Ito Diurnal changes in glycogen content in the pineal cells of the male mouse : a quantitative histochemical study. *Z. Zellforsch.*, 118: 310 ~ 314 (1971).
- 68) Matsushima, S. and Y. Morisawa Quantitative morphological studies on pinealocytes of the chinese hamster, Cricetulus griseus. *Jikeikai Med. J.*, 28 (Suppl. 1) : 29~34 (1981).
- 69) Quay, W.B. and A. Renzoni Twenty-four-hour rhythm in pineal mitotic activity and nucleolar dimentions. *Growth*, 30: 315 ~ 324 (1967).
- 70) Lew, G.M., A. Payer and W.B. Quay The pinealocyte nucleolus Ultrastructural and stereological analysis of twenty-four-hour changes. *Cell Tissue Res.*, 224: 195~206 (1982).
- 71) Becker, U.G. and L. Vollrath 24-hour variation of pineal gland volume, pinealocyte nuclear volume and mitotic activity in male Sprague-Dawley rats. *J. Neural Transm.*, 56: 211 ~ 221 (1983).
- 72) Reuber, H. and L. Vollrath Mitotic activity and its 24-hour rhythm in the rat pineal gland. *Acta anat.*, 117:121 ~ 127 (1983).
- 73) Romijn, H.J., M.T. Mud and P.S. Wolters Diurnal variations in number of Golgi-dense core vesicles in light pinealocytes of the rabbit. *J. Neural Transm.*, 38: 231~237 (1976).
- 74) Benson, B. and M. Krasovich Circadian rhythm in the number of granulated vesicles in the pinealocytes of mice. Effects of sympathectomy and melatonin treatment. *Cell*

- Tissue Res., 184: 499~506 (1977).
- 75) Vollrath, L. Synaptic ribbons of a mammalian pineal gland : circadian changes. Z. Zellforsch., 145: 171~183 (1973).
- 76) Kurumado, K. and W. Mori A morphological study of the circadian cycle of the pineal gland of the rat. Cell Tissue Res., 182: 565~568 (1977).
- 77) Vollrath, L., R.L. Schultz and P.J. McMillan Synaptic ribbons and sperules of the guinea pig pineal gland : inverse day/night differences in number. Am. J. Anat., 168: 67 ~ 74 (1983).
- 78) Axelrod, J., R.J. Wurtman and C.M. Winget Melatonin synthesis in the hen pineal gland and its control by light. Nature, 201: 1134 (1964).
- 79) Lerner, A.B., J.D. Case, Y. Takahashi, T.H. Lee and W. Mori Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. J. Amer. Chem. Soc., 80: 2587 (1958).
- 80) Lovenberg, W., E. Jequier and A. Sjoerdsma Tryptophan hydroxylation : measurements in pineal gland, brain stem, and carcinoid tumor. Science, 155: 217~218 (1967).
- 81) Lovenberg, W., H. Weissbach and S. Udenfriend Aromatic L-amino acid decarboxylase. J. Biol. Chem., 237: 89~92 (1962).
- 82) Weissbach, H., B.G. Redfield and J. Axelrod Biosynthesis of melatonin : enzymatic conversion of serotonin to N-acetylserotonin. Biochim. Biophys. Acta, 43: 352~353 (1960).

- 83) Axelrod, J. and H. Weissbach Purification and properties of hydroxyindole-O-methyl transferase. J. Biol. Chem., 236: 211~213 (1961).
- 84) Quay, W.B. Circadian rhythm in rat pineal serotonin and its modification by estrous cycle and photoperiod. Gen. Comp. Endocrinol., 3: 473~479 (1963).
- 85) Quay, W.B. Circadian and estrous rhythms in pineal melatonin and 5-hydroxyindole-3-acetic acid. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 115: 710~713 (1964).
- 86) Lynch, H.J. Diurnal oscillations in pineal melatonin content. Life Sci., 10: 791~795 (1971).
- 87) Pang, S.F. and C.L. Ralph Pineal and serum melatonin at midday and midnight following pinealectomy or castration in male rats. J. Exp. Zool., 193: 273~280 (1975).
- 88) Binkley, S., S.E. MacBride, D.C. Klein and C.L. Ralph Regulation of pineal rhythms in chickens : refractory period and nonvisual light perception. Endocrinology, 96: 848 ~ 853 (1975).
- 89) Binkley, S., J.L. Stephens, J.B. Riebman and K.B. Reilly Regulation of pineal rhythms in chickens : photoperiod and dark-time sensitivity. Gen. Comp. Endocrinol., 32: 411~416 (1977).
- 90) Deguchi, T. and J. Axelrod Sensitive assay for serotonin N-acetyltransferase activity in rat pineal. Analt. Biochem., 50: 174~179 (1972).
- 91) Deguchi, T. Role of adenosin 3',5'-monophosphate in the regulation of circadian oscillation of serotonin N-acetyltransferase activity in cultured chicken pineal gland.

- J. Neurochem., 33: 45~51 (1979).
- 92) 出口武夫 ほ乳動物における体内時計の形成過程, バイオリズムとその機構 (須田正巳・早石 修・中川八郎編), pp 104~118, 講談社サイエンティフィック, 東京 (1976).
- 93) 出口武夫 生体リズムの神経調節とその個体発生の機序, 現代の神経科学 I, 伝達物質と受容物質 (大塚正徳・竹内 昭編), pp 205~223, 産業図書, 東京 (1976).
- 94) Deguchi, T. Circadian rhythm of serotonin N-acetyltransferase activity in organ culture of chicken pineal gland. Science, 203: 1245~1247 (1979).
- 95) Deguchi, T. A circadian oscillator in cultured cells of chicken pineal gland. Nature, 282: 94~96 (1979).
- 96) Deguchi, T. and J. Axelrod Control of circadian change of serotonin N-acetyltransferase activity in the pineal organ by the β -adrenergic receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 69: 2547~2550 (1972).
- 97) Klein, D.C. and J.L. Weller Rapid light-induced decrease in pineal serotonin N-acetyltransferase activity. Science, 177: 532~533 (1972).
- 98) Minneman, R.P., H. Lynch and R.J. Wurtman Relationship between environmental light intensity and retina-mediated suppression of rat pineal serotonin N-acetyltransferase. Life Sci., 15: 1791~1796 (1974).
- 99) 土井 守・中村孝雄・田名部雄一 ウズラ松果体におけるセロトニン N-アセチルトランスフェラーゼ活性の光周期変化と諸薬剤投与の効果, 日畜会報, 54: 363~368 (1983).
- 100) Binkley, S., D.C. Klein and J.L. Weller Dark induced increase in pineal serotonin N-acetyltransferase activity:

- a refractory period. *Experientia*, 29: 1339~1340 (1973).
- 101) Ralph, C.L., S. Binkley, S.E. MacBride and D.C. Klein
Regulation of pineal rhythms in chickens : effects of
blinding, constant light, constant dark, and superior
cervical ganglionectomy. *Endocrinology*, 97: 1373~1378
(1975).
- 102) Binkley, S. and E.B. Geller Pineal N-acetyltransferase in
chickens : rhythm persists in constant darkness. *J. Comp.
Physiol.*, 99: 67~70 (1975).
- 103) Binkley, S., J.L. Stephens, J.B. Riebman and K.B. Reilly
Regulation of pineal rhythms in chickens : photoperiod and
dark-time sensitivity. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 32: 411~
416 (1977).
- 104) Binkley, S. Pineal rhythms in vivo and in vitro. *Comp.
Biochem. Physiol.*, 64A: 201~206 (1979).

写 真 説 明

- 図 1 ~ 14 発生初期のニワトリ胚子から成鶏にいたる松果体の組織構造の変化 (図 1 : 孵卵 3 日目, 図 2 : 孵卵 3.5 日目, 図 3 : 孵卵 4 日目, 図 4 : 孵卵 5 日目, 図 5 : 孵卵 6 日目, 図 6 : 孵卵 8 日目, 図 7 : 孵卵 10 日目, 図 8 : 孵卵 12 日目, 図 9 : 孵卵 14 日目, 図 10 : 孵卵 16 日目, 図 11 : 孵卵 20 日目, 図 12 : 孵化日, 図 13 : 1 日 齢, 図 14 : 90 日 齢), Mayer のヘマトキシリン・ポリクロマチックエオシン染色, 20 倍。
- 図 15 孵卵 4 日目のニワトリ胚子の松果体側方部にみられるロゼット構造, Mayer のヘマトキシリン・ポリクロマチックエオシン染色, 400 倍。
- 図 16 孵卵 18 日目のニワトリ胚子の松果体組織における小胞 (F) 及び傍小胞域 (PF)。柱状細胞が放射状に配列した小胞と、その周囲には腺組織に類似した傍小胞域が観察された。Mayer のヘマトキシリン・ポリクロマチックエオシン染色, 400 倍。
- 図 17 16 日 齢のニワトリひなの松果体にみられる大型のリンパ小節。間質に存在していたリンパ細胞が、松果体の前方部や頭頂部で多数集合して、リンパ小節を形成し、なかには実質の約 $1/3$ を占めるものも観察された。Mayer のヘマトキシリン・ポリクロマチックエオシン染色, 40 倍。
- 図 18 1 日 齢のニワトリひなの松果体組織。特に前方部で大型の小胞が多数みられたが、小葉構造は不明確であった。Mayer のヘマトキシリン・ポリクロマチックエオシン染色, 100 倍。
- 図 19 90 日 齢のニワトリの松果体組織。大型の小胞はほとんど崩壊し、主にロゼットと小型の小胞で形成され、小葉構造を

呈していた。Mayerのヘマトキシリン・ポリクロマチックエオシン染色，100倍。

- 図 20 2年 齢のニワトリの松果体組織。実質細胞はほとんどすべてがロゼット様構造を示し、間質には結合組織と血管が豊富に存在していた。Mayerのヘマトキシリン・ポリクロマチックエオシン染色，100倍。
- 図 21～26 発生初期のニワトリ胚子から成鶏にいたる期間の松果体における酸性ホスファターゼの分布（図 21：孵卵6日目，図 22：孵卵8日目，図 23：孵卵12日目，図 24：孵卵18日目，図 25：孵化日，図 26：2年 齢），100倍。
- 図 27～31 発生初期のニワトリ胚子から成鶏にいたる期間の松果体におけるアルカリ性ホスファターゼの分布（図 27：孵卵10日目，図 28：孵卵14日目，図 29：孵卵18日目，図 30：孵化日，図 31：2年 齢），100倍。
- 図 32～36 発生初期のニワトリ胚子から成鶏にいたる期間の松果体におけるモノアミン酸化酵素の分布（図 32：孵卵10日目，図 33：孵卵14日目，図 34：孵卵18日目，図 35：孵化日，図 36：2年 齢），100倍。
- 図 37～42 発生初期のニワトリ胚子から成鶏にいたる期間の松果体におけるコハク酸脱水素酵素の分布（図 37：孵卵10日目，図 38：孵卵12日目，図 39：孵卵14日目，図 40：孵卵18日目，図 41：孵化日，図 42：2年 齢），100倍。
- 図 43 1日 齢のニワトリひなの松果体組織。松果体組織は、豊富な血管と多数のリンパ細胞をともなった結合組織によって囲まれていた。Mayerのヘマトキシリン・ポリクロマチックエオシン染色，40倍。
- 図 44 34日 齢のニワトリひなの松果体にみられた小胞（F）及び傍小胞域（PF）。柱状細胞が放射状に配列した小胞と、その周

- 図には腺組織に類似した傍小胞域が観察された。Mayerのヘマトキシリン・ポリクロマチックエオシン染色，100倍。
- ☒ 45 56日齢ニワトリひなの松果体にみられる小胞の柱状細胞。柱状で円形大型の核をもつ松果体細胞と、それらの間にわずかに存在する細長い支持細胞がみられる。Mayerのヘマトキシリン・ポリクロマチックエオシン染色，400倍。
- ☒ 46 アルデヒドフクシン染色を行った場合のニワトリ松果体の小胞。400倍。
- ☒ 47 トルイジン青染色を行った場合のニワトリ松果体の小胞。400倍。
- ☒ 48 Regaudのヘマトキシリン染色を行った場合のニワトリ松果体の小胞。400倍。
- ☒ 49 Massonのトリクローム染色 Goldner変法を行った場合のニワトリ松果体の小胞。400倍。
- ☒ 50 チオニンメチレン青染色を行った場合のニワトリ松果体にみられる小胞細胞。1000倍。
- ☒ 51 過ヨウ素酸メチレン青アズールⅡ染色を行った場合のニワトリ松果体にみられる小胞細胞。400倍。
- ☒ 52 トルイジン青染色を行った場合のニワトリ松果体にみられる小胞細胞。1000倍。
- ☒ 53 チオニンメチレン青染色をほどこした時にみられる小胞腔内の異染性を示す内容物。400倍。
- ☒ 54 ニワトリひなの松果体における傍小胞域。傍小胞細胞は小胞細胞に比べて細胞質内の可染顆粒はわずかであった。チオニンメチレン青染色。1000倍。
- ☒ 55と56 10日齢のニワトリひなの松果体にみられた神経細胞（☒ 55）及び神経線維（☒ 56）。Cajalの鍍銀法の第2法，400倍。

- ☒ 57と58 23日齡のニワトリひなの松果体におけるリン脂質の分布。多数の可染顆粒は、ピリジン抽出により消失した（☒ 58）。酸ヘマテイン法，100倍。
- ☒ 59と60 ニワトリ松果体の小葉間結合組織。（☒ 59：van Gieson染色Hansen改良法 200倍，☒ 60：azan染色 100倍）。
- ☒ 61 P A S 反応を行った場合のニワトリの松果体組織。100倍。
- ☒ 62～67 ニワトリひなの松果体における各酵素の分布（☒ 62：酸性ホスファターゼ，☒ 63：アルカリ性ホスファターゼ，☒ 64：モノアミン酸化酵素，☒ 65：コハク酸脱水素酵素，☒ 66：D O P A 酸化酵素，☒ 67：リパーゼ），100倍。
- ☒ 68～70 連続暗黒下で孵卵したニワトリ胚子における松果体組織（☒ 68：孵卵14日目，☒ 69：孵卵18日目，☒ 70：孵化日）。Mayerのヘマトキシリン・ポリクロマチックエオシン染色，20倍。
- ☒ 71～73 連続照明下で孵卵したニワトリ胚子における松果体組織（☒ 71：孵卵14日目，☒ 72：孵卵18日目，☒ 73：孵化日）。Mayerのヘマトキシリン・ポリクロマチックエオシン染色，20倍。
- ☒ 74と75 連続暗黒下で孵卵したニワトリ胚子における松果体の小胞細胞。松果体細胞は柱状で円形大型の核を有し、核上部の長さは多様であった。（☒ 74：孵卵14日目，☒ 75：孵化日），チオニンメチレン青染色，1000倍。
- ☒ 76と77 連続照明下で孵卵したニワトリ胚子における松果体の小胞細胞。松果体細胞は大変萎縮しており、核も不整形で核上部の長さは一様であった。（☒ 76：孵卵14日目，☒ 77：孵化日），チオニンメチレン青染色，1000倍。
- ☒ 78 連続照明下で孵卵した場合の孵卵18日目のニワトリ松果体

にみられる小胞腔内の異染色性顆粒と空胞。チオニンメチレン青染色， 400倍。

図79， 80，
83及び84 連続暗黒下で孵卵した場合の孵化日のニワトリ松果体における酸性ホスファターゼ（図 79），アルカリ性ホスファターゼ（図 80），モノアミン酸化酵素（図 83）及びコハク酸脱水素酵素（図 84）の分布。 100倍。

図81， 82，
85及び86 連続照明下で孵卵した場合の孵化日のニワトリ松果体における酸性ホスファターゼ（図 81），アルカリ性ホスファターゼ（図 82），モノアミン酸化酵素（図 85）及びコハク酸脱水素酵素（図 86）の分布。 100倍。

図 87～94 ニワトリひなの松果体組織における小胞構造とその構成細胞の日周変化（図 87：6時 400倍，図 88：6時 1000倍，図 89：12時 400倍，図 90：12時 1000倍，図 91：18時 400倍，図 92：18時 1000倍，図 93：24時 400倍，図 94：24時 1000倍），過ヨウ素酸メチレン青アズールⅡまたはトルイジン青染色。

図96～98，
102及び
103 12時に採取した2年齢ニワトリ松果体における酸性ホスファターゼ（図 96），アルカリ性ホスファターゼ（図 97），モノアミン酸化酵素（図 98），コハク酸脱水素酵素（図 102）及びグルコース-6-リン酸脱水素酵素（図 103）の分布。 100倍。

図99～101，
104及び
105 24時に採取した2年齢ニワトリ松果体における酸性ホスファターゼ（図 99），アルカリ性ホスファターゼ（図 100），モノアミン酸化酵素（図 101），コハク酸脱水素酵素（図 104）及びグルコース-6-リン酸脱水素酵素（図 105）の分布。 100倍。



图 1



图 5



图 2

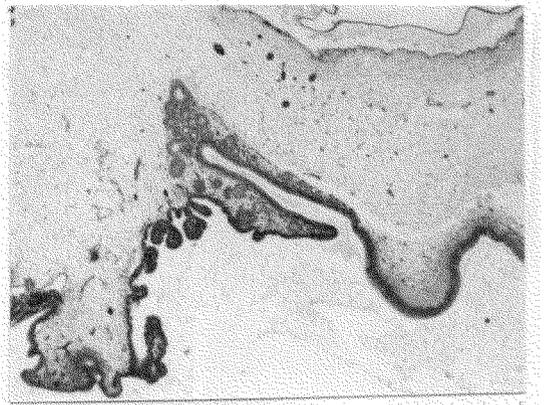


图 6

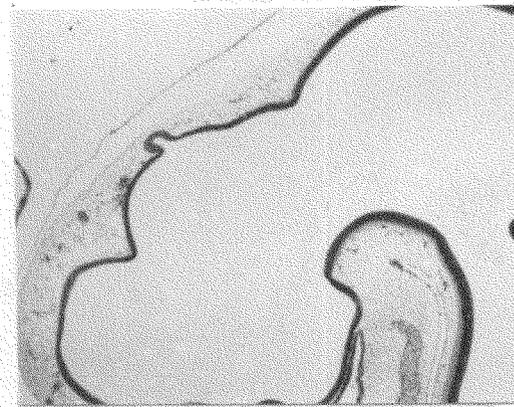


图 3

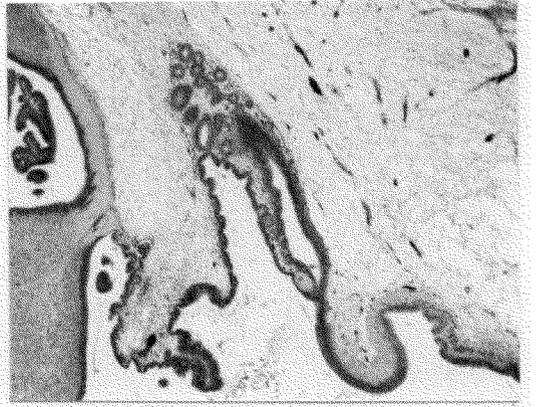


图 7

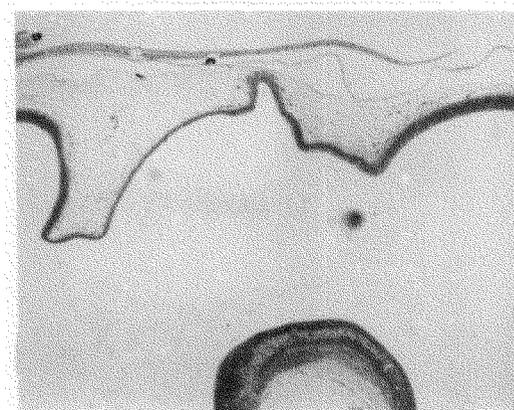


图 4

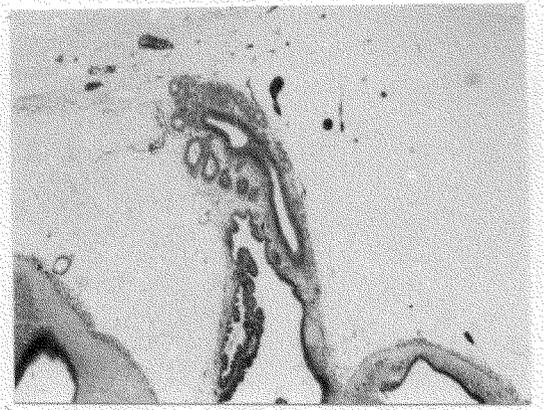
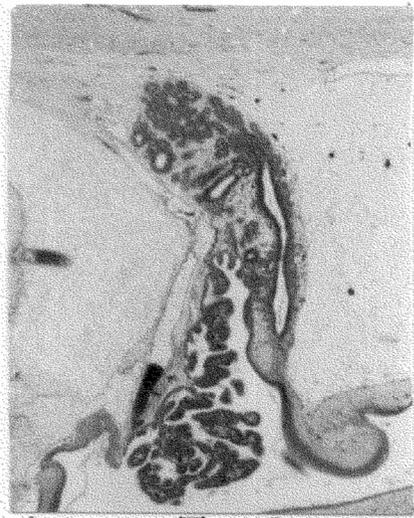


图 8



☒ 9



☒ 12



☒ 10



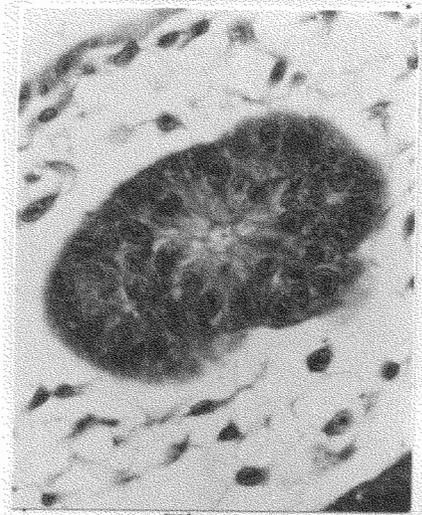
☒ 13



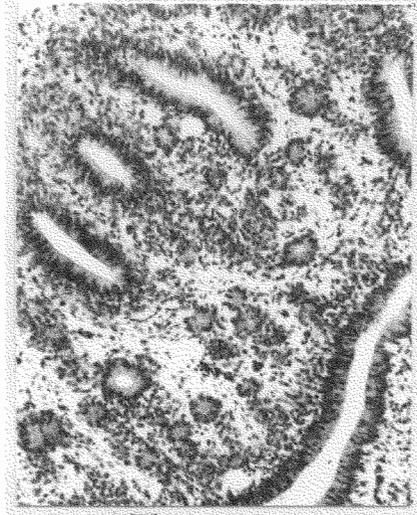
☒ 11



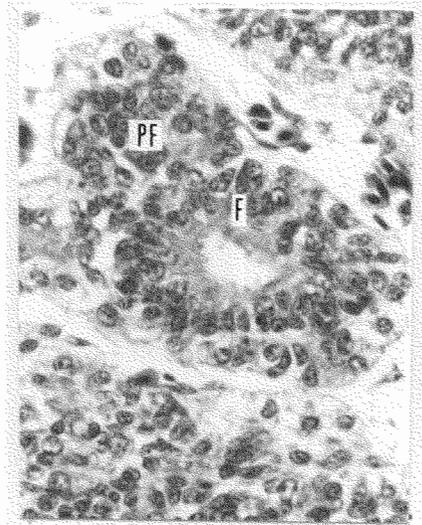
☒ 14



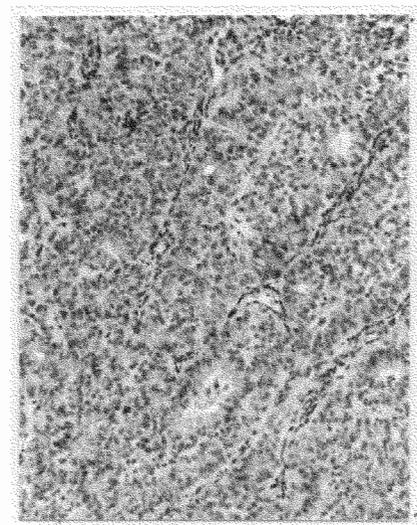
☒ 15



☒ 18



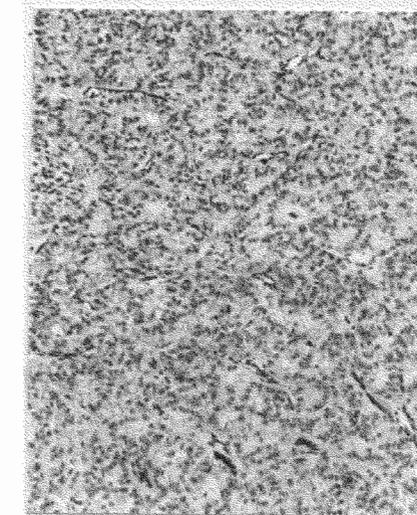
☒ 16



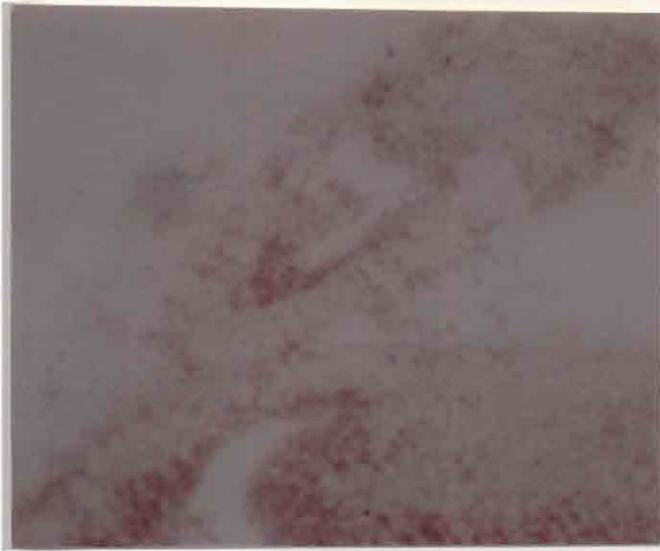
☒ 19



☒ 17



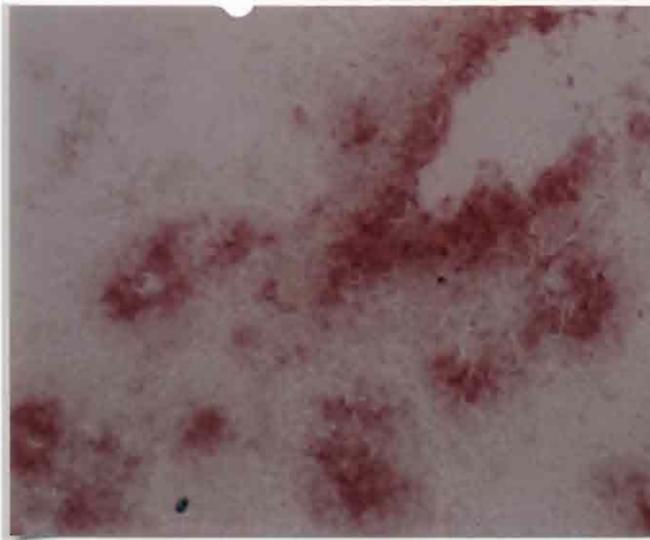
☒ 20



☒ 21



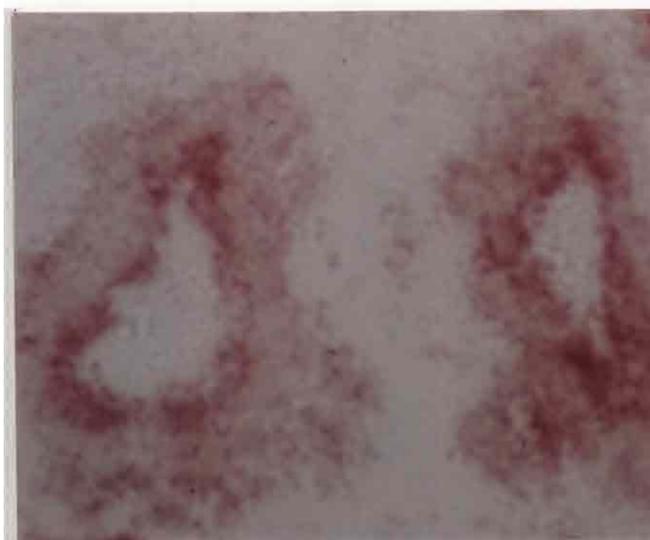
☒ 24



☒ 22



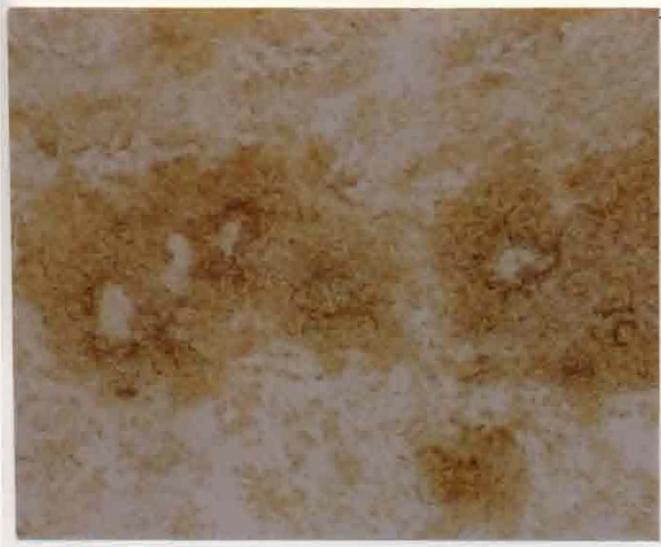
☒ 25



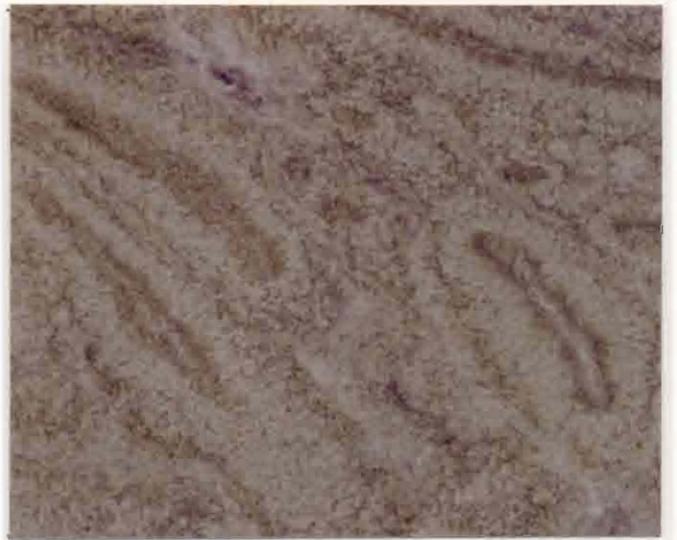
☒ 23



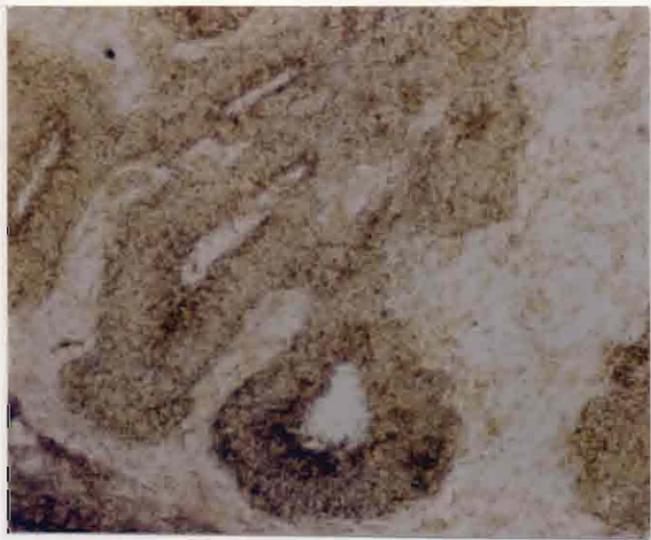
☒ 26



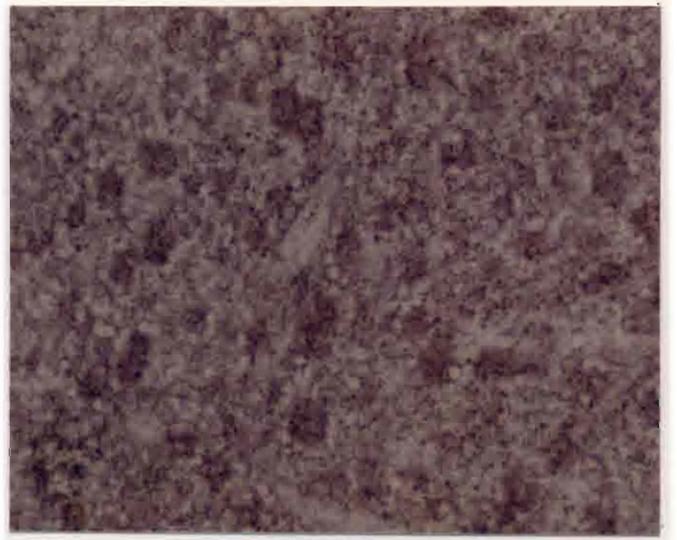
☒ 27



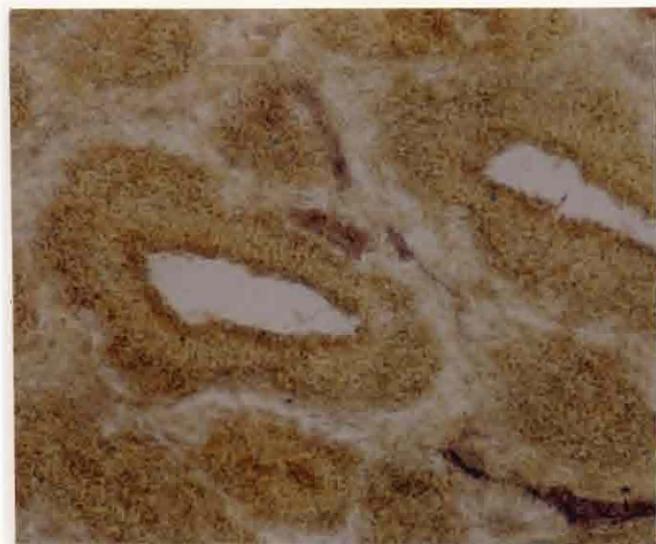
☒ 30



☒ 28



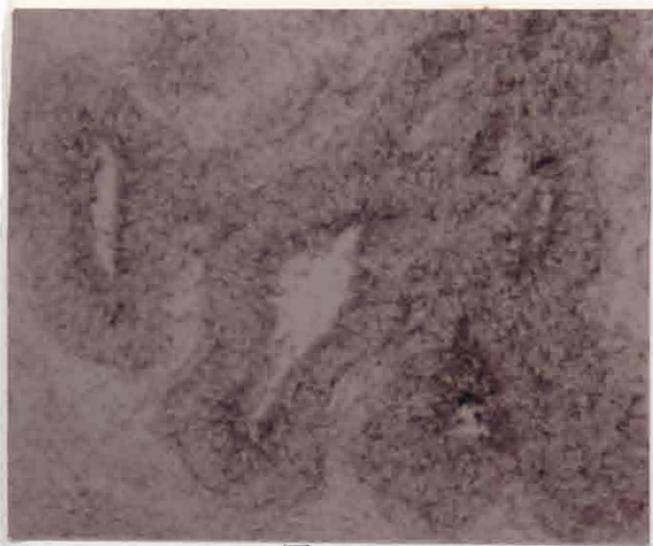
☒ 31



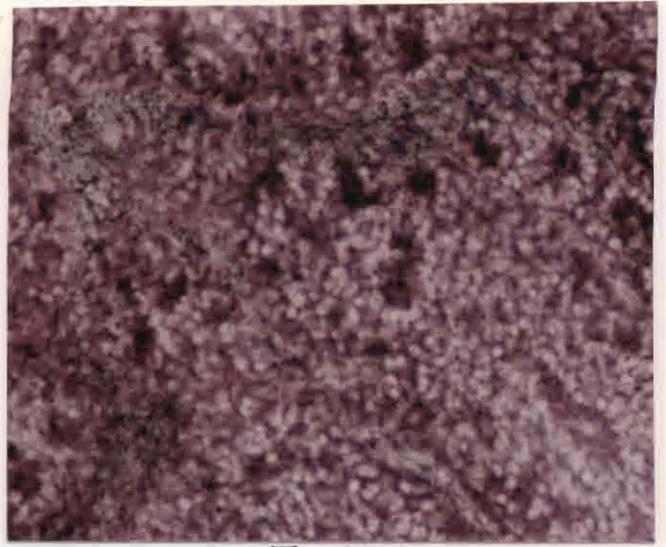
☒ 29



☒ 32



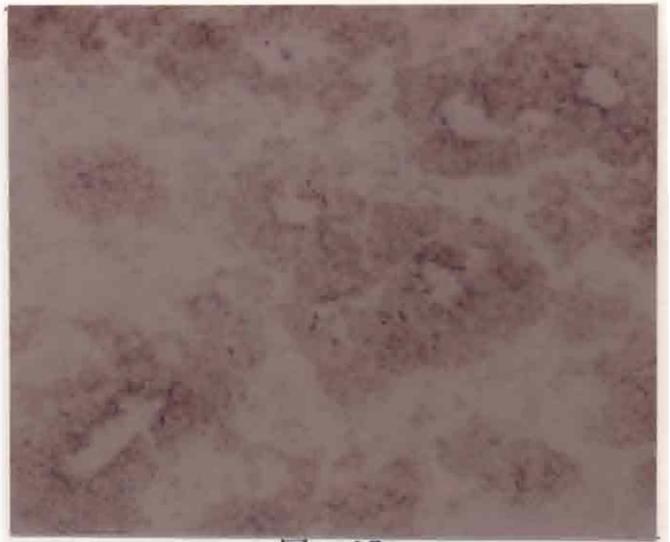
☒ 33



☒ 36



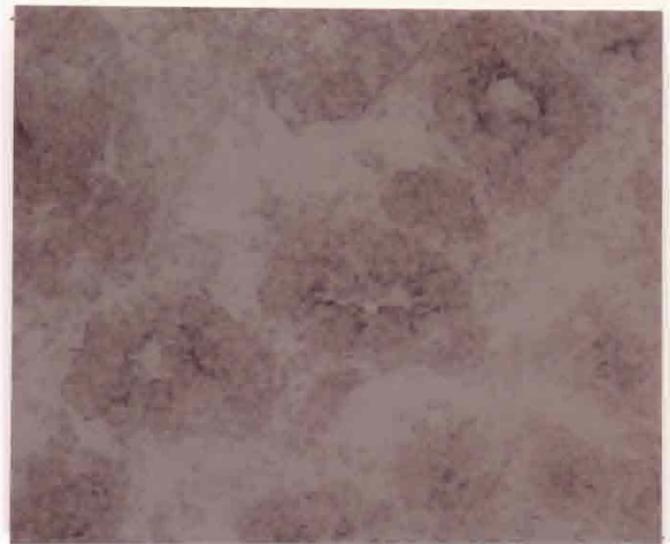
☒ 34



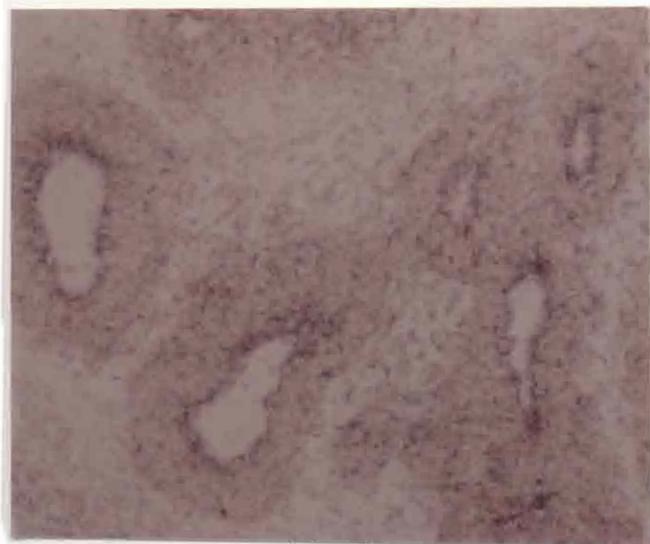
☒ 37



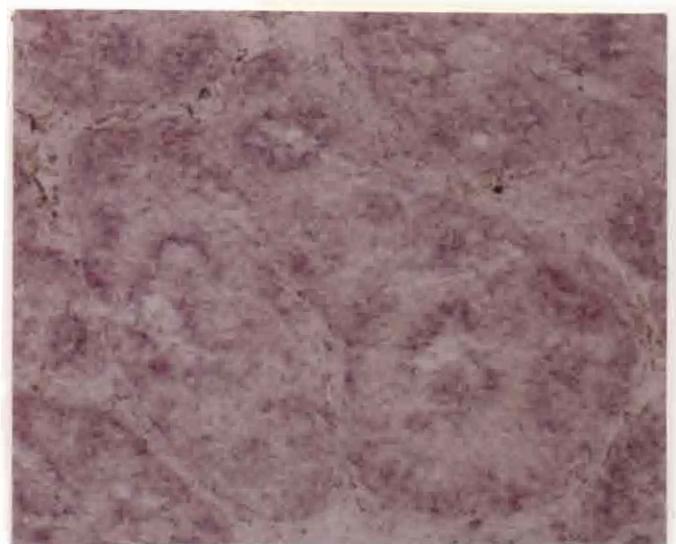
☒ 35



☒ 38



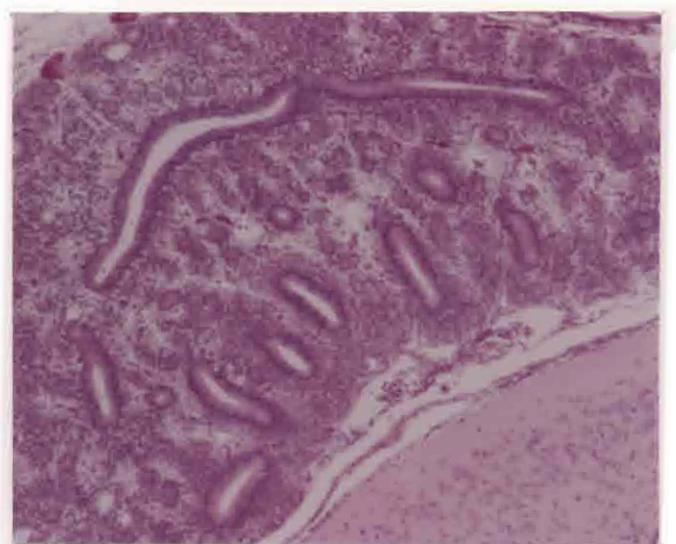
☒ 39



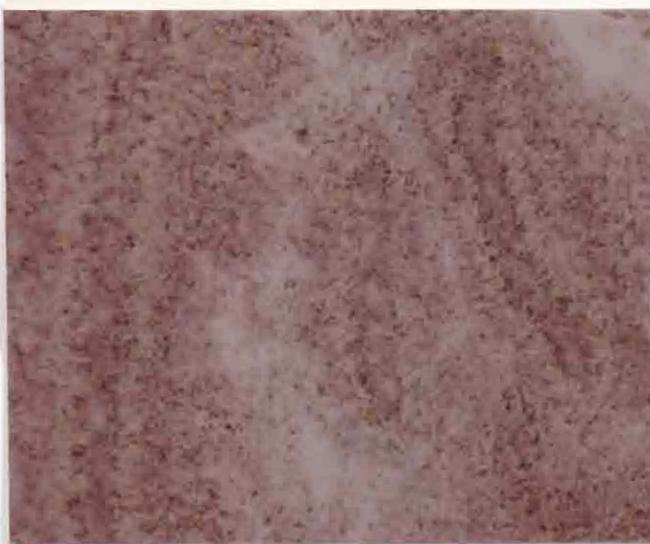
☒ 42



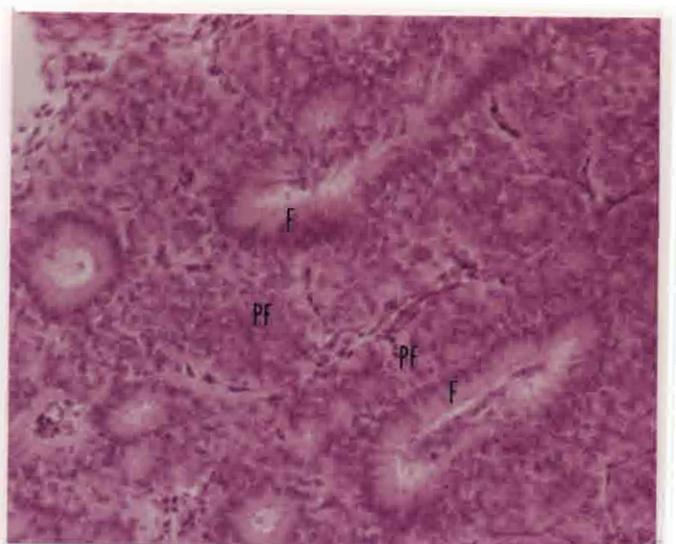
☒ 40



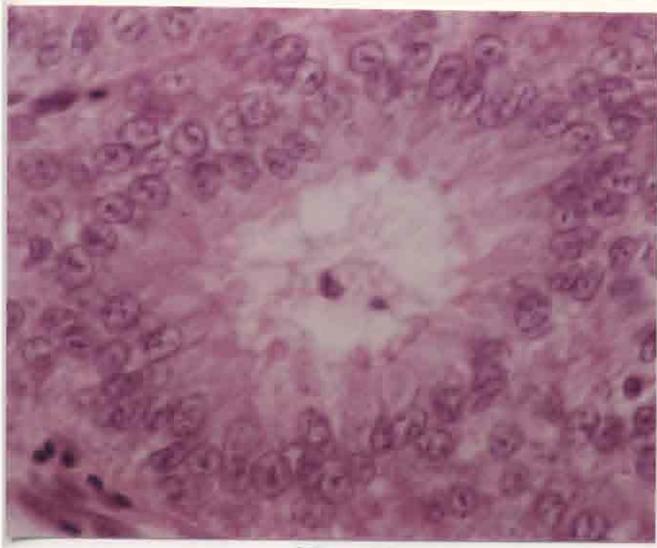
☒ 43



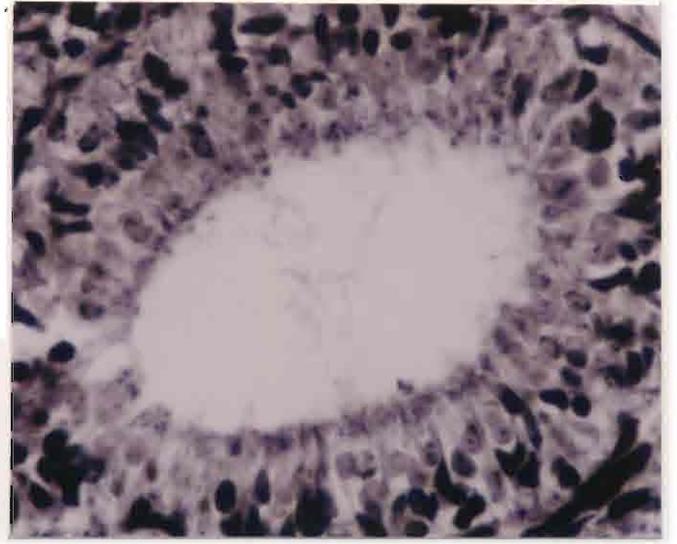
☒ 41



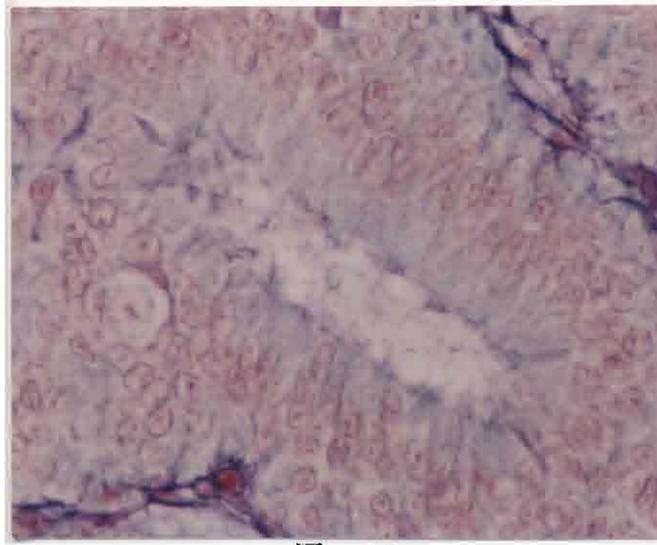
☒ 44



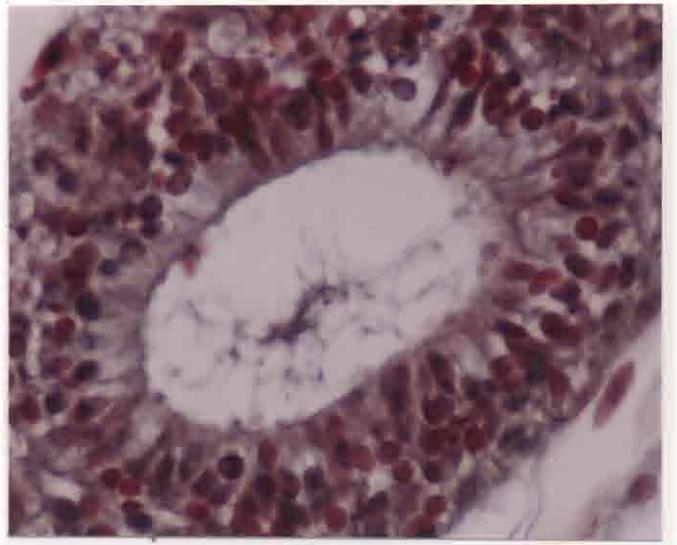
☒ 45



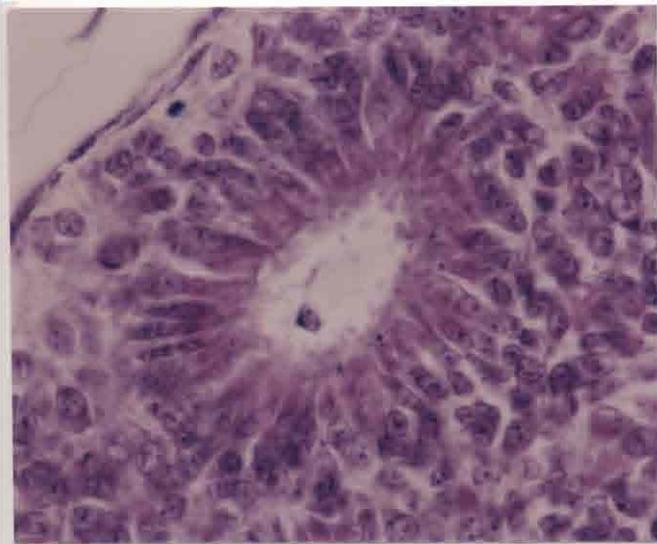
☒ 48



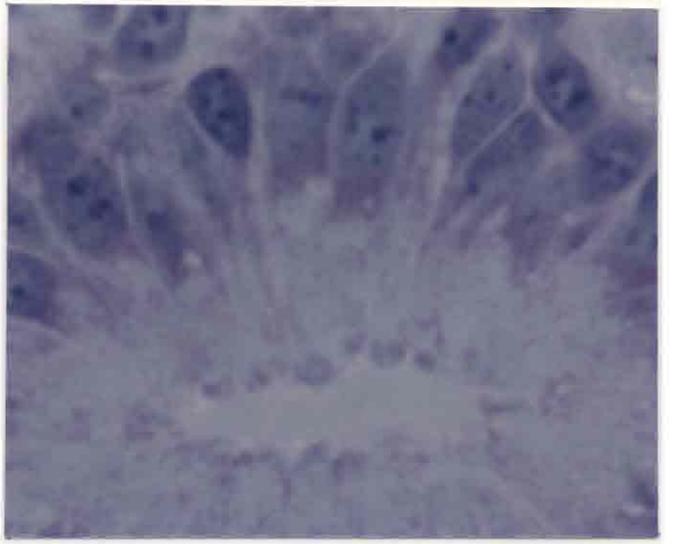
☒ 46



☒ 49



☒ 47



☒ 50

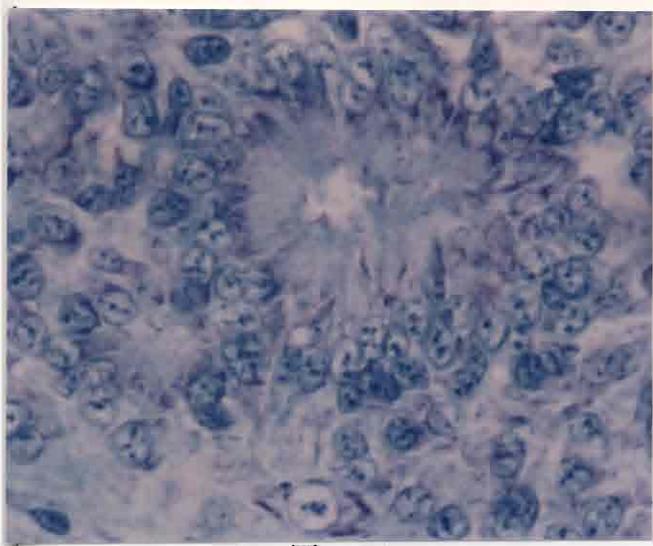


图 51

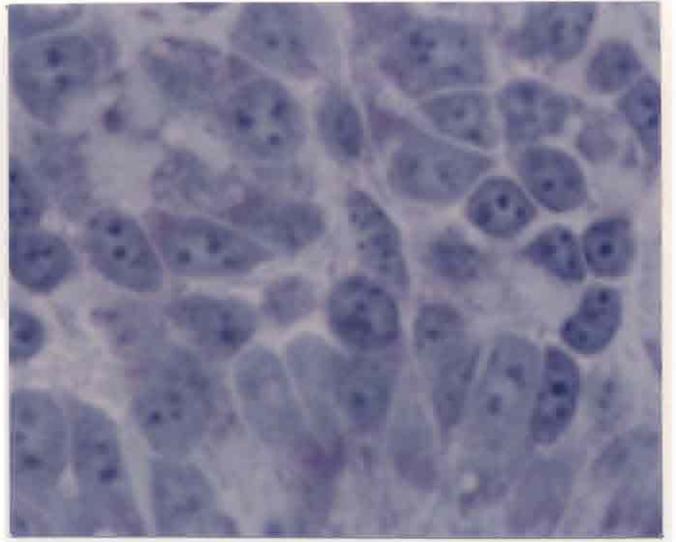


图 54

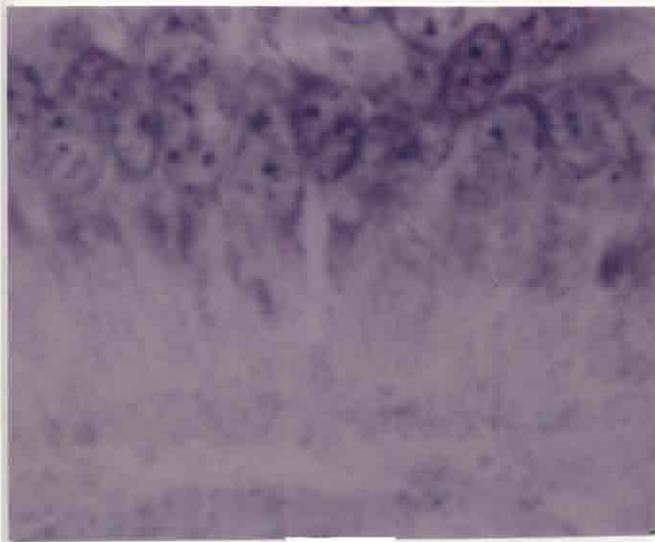


图 52

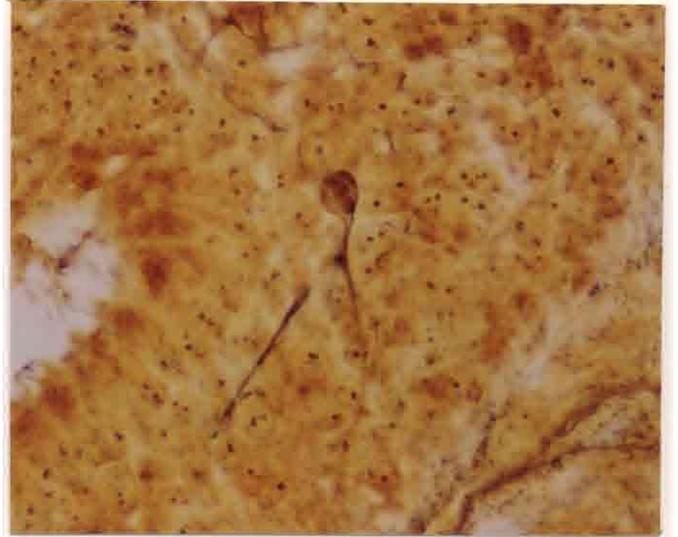


图 55

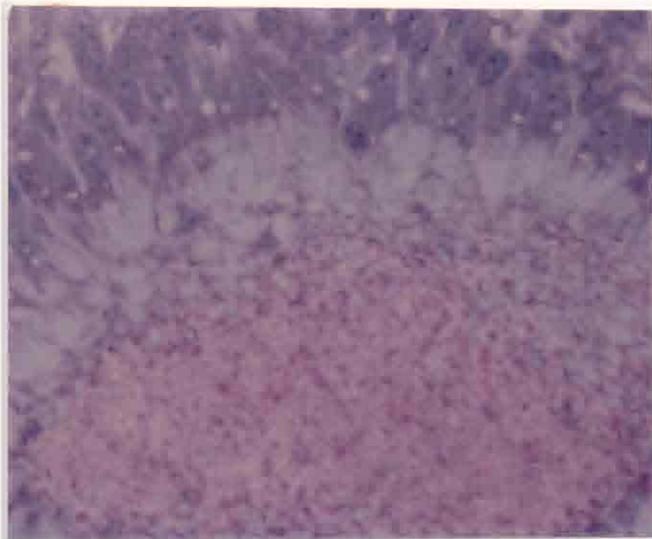


图 53

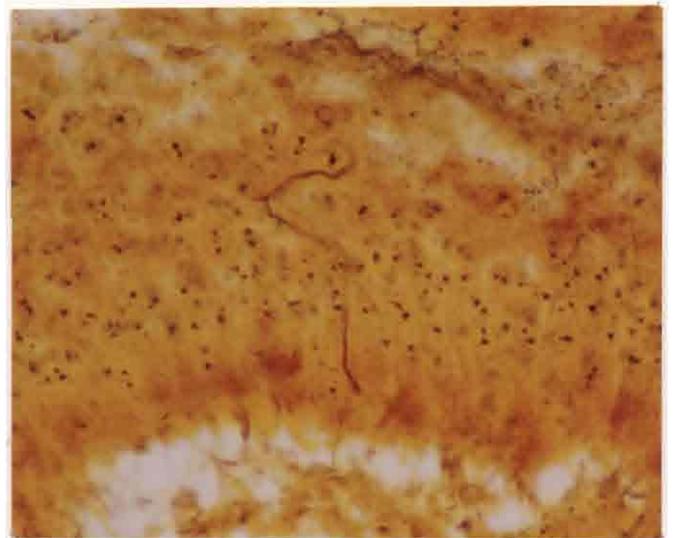


图 56

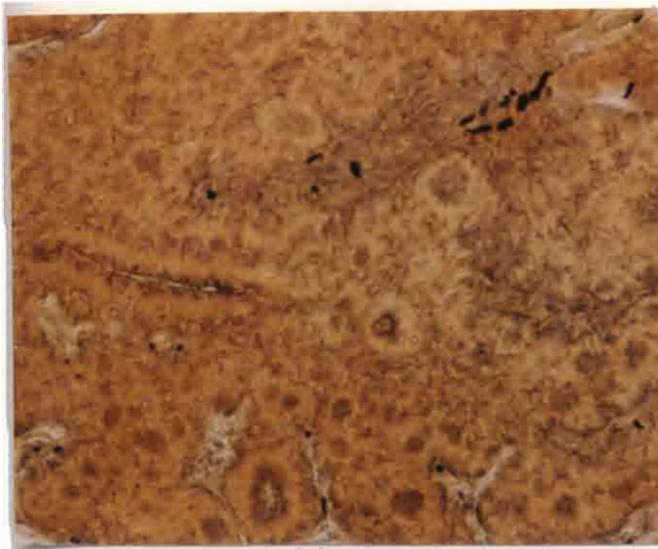


图 57

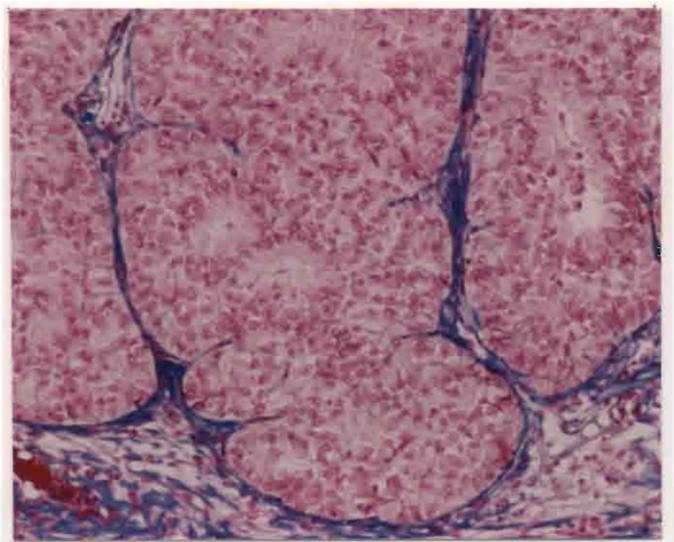


图 60

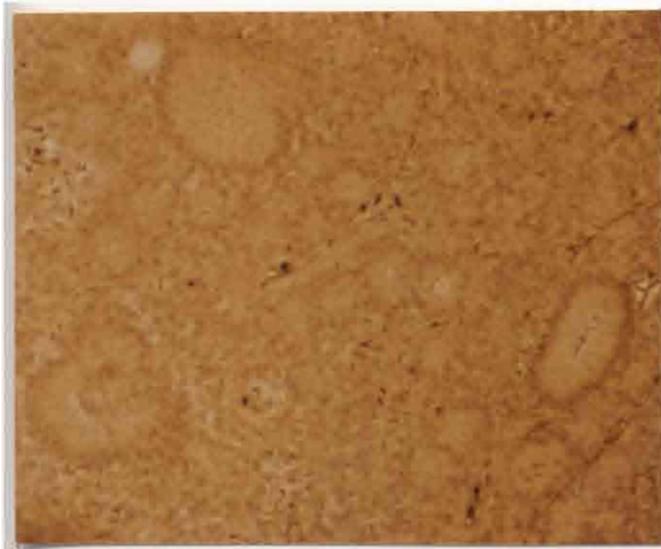


图 58

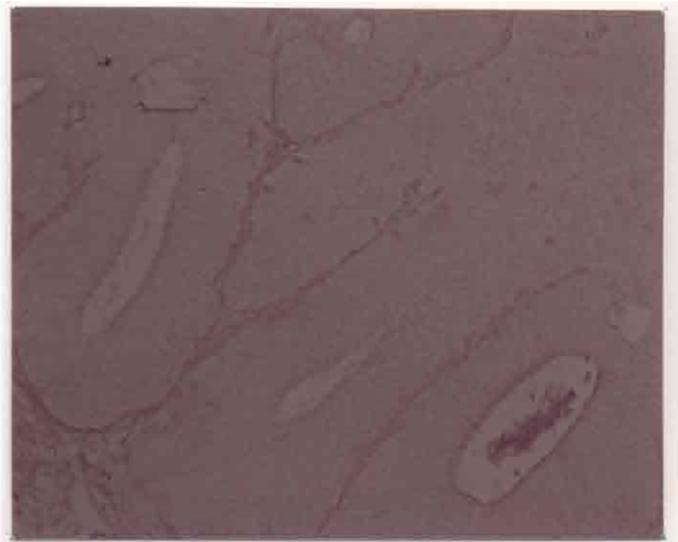


图 61

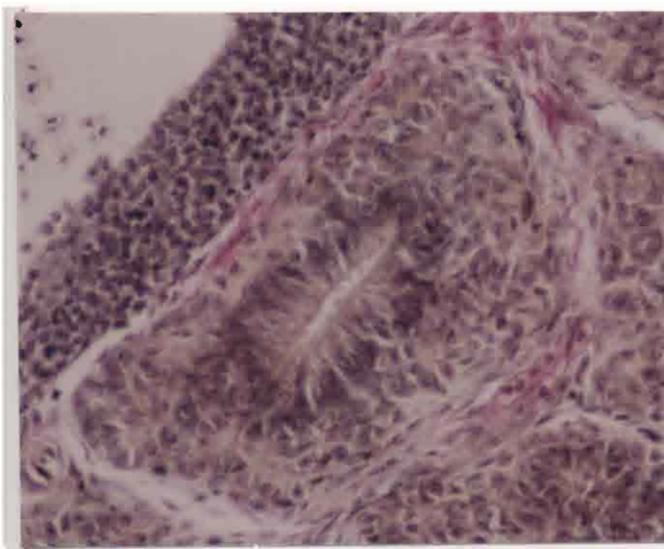
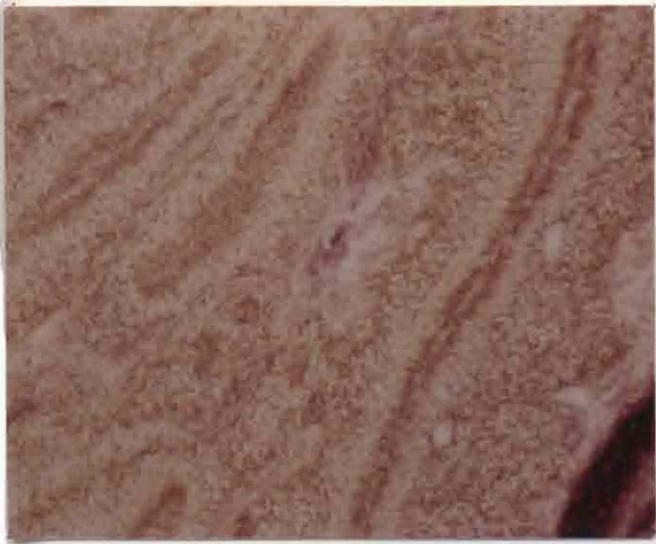


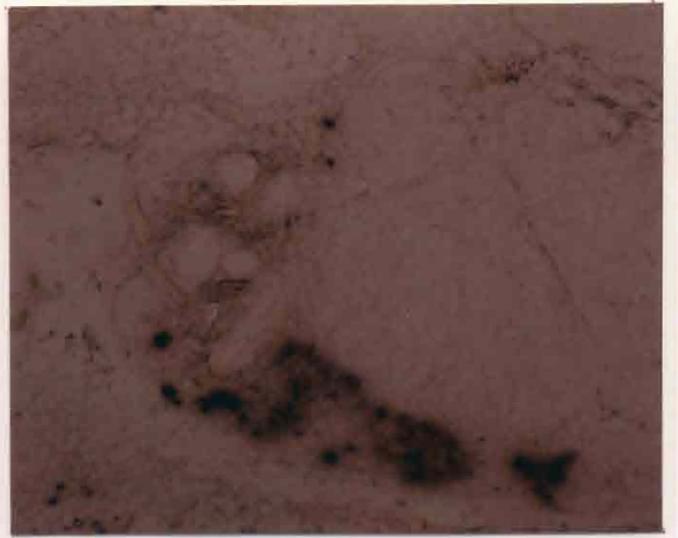
图 59



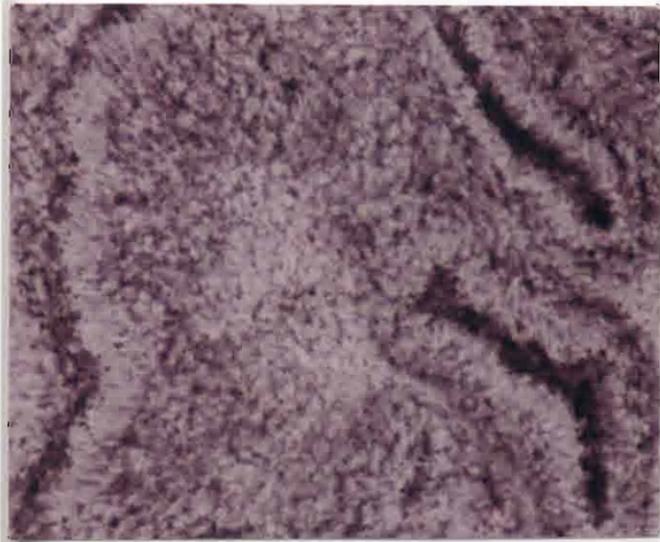
图 62



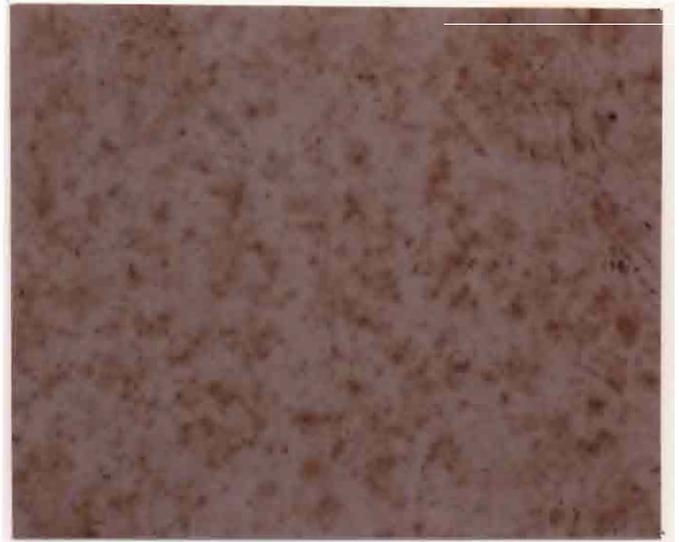
☒ 63



☒ 66



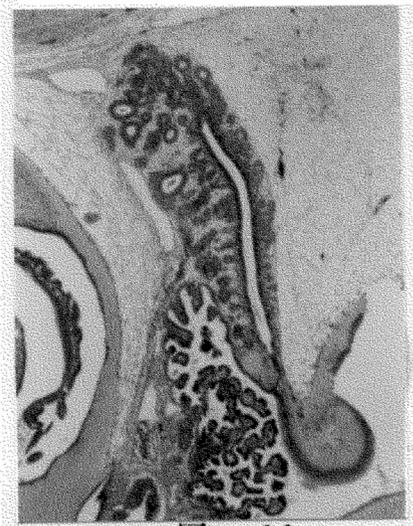
☒ 64



☒ 67



☒ 65



☒ 68



☒ 71



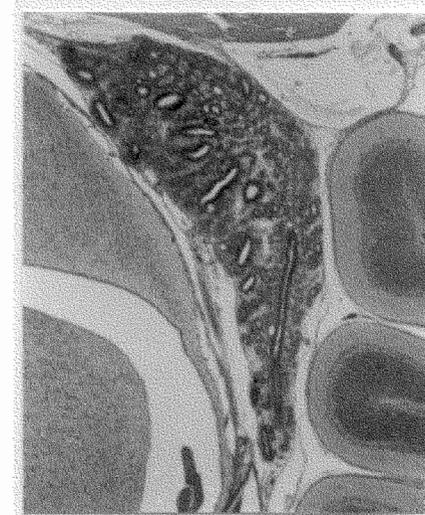
☒ 69



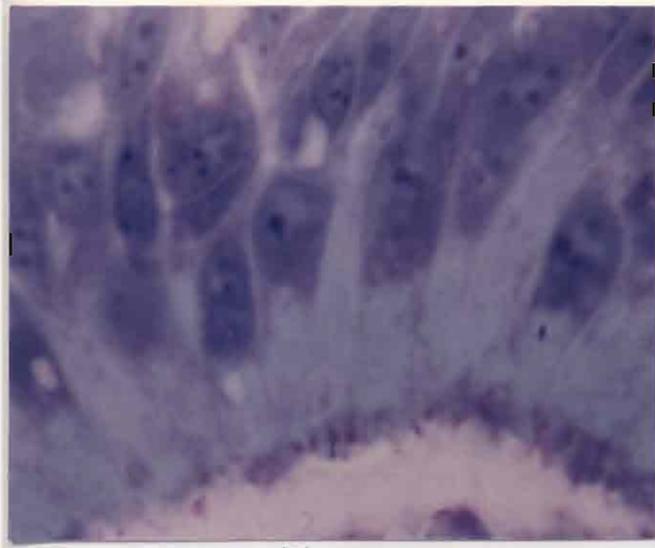
☒ 72



☒ 70



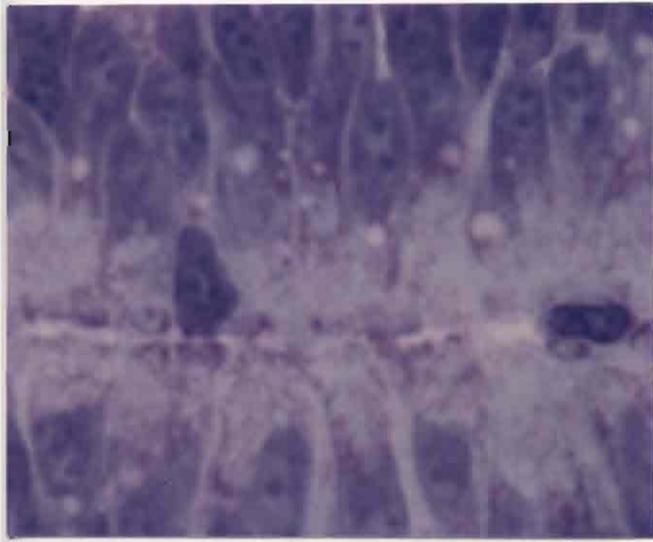
☒ 73



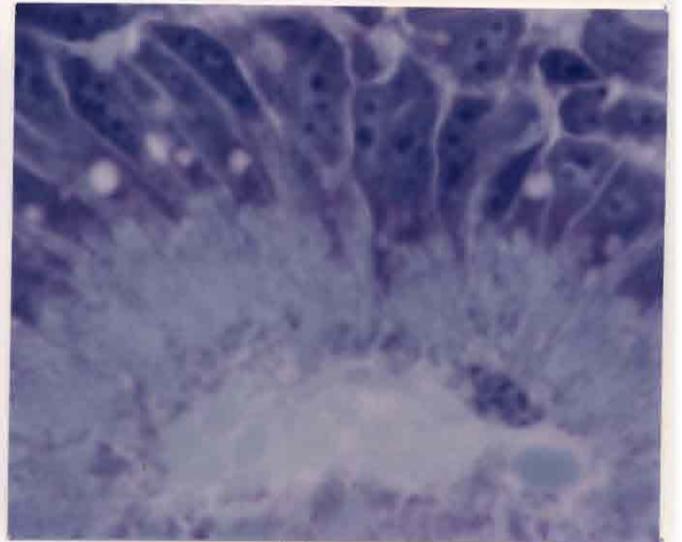
☒ 74



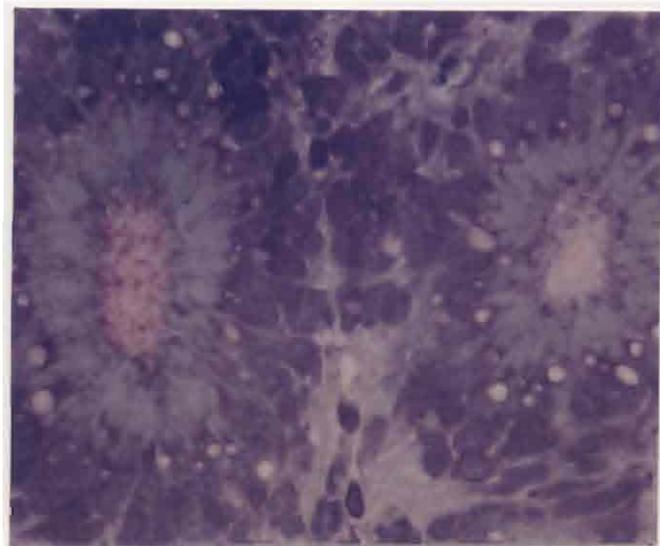
☒ 76



☒ 75



☒ 77



☒ 78

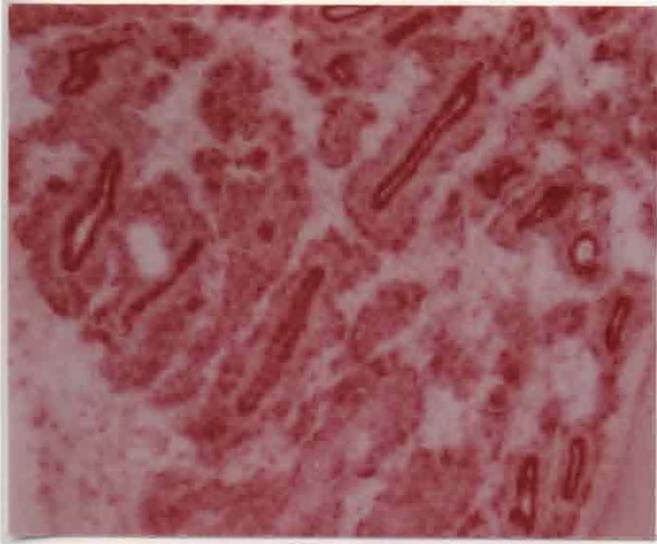


图 79

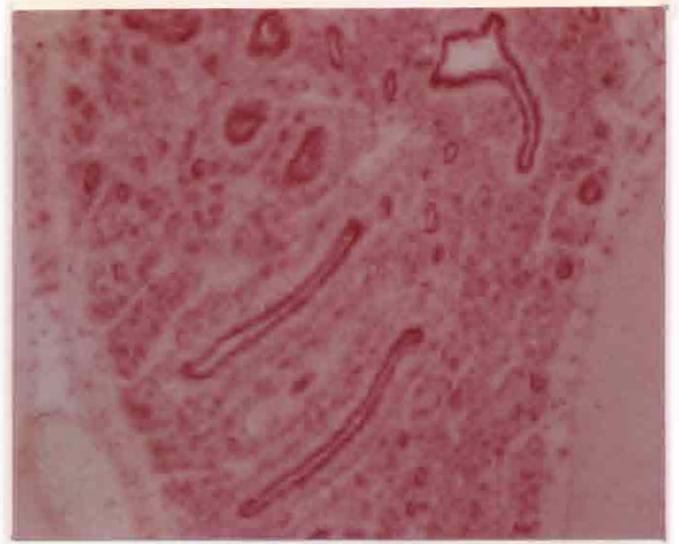


图 81

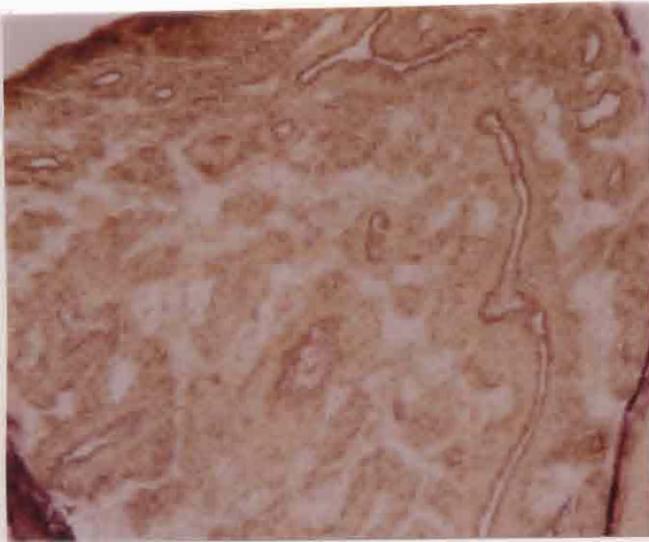


图 80

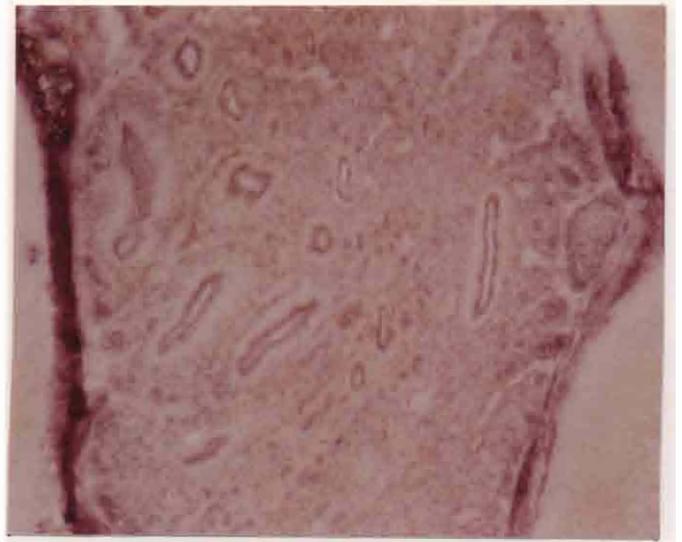
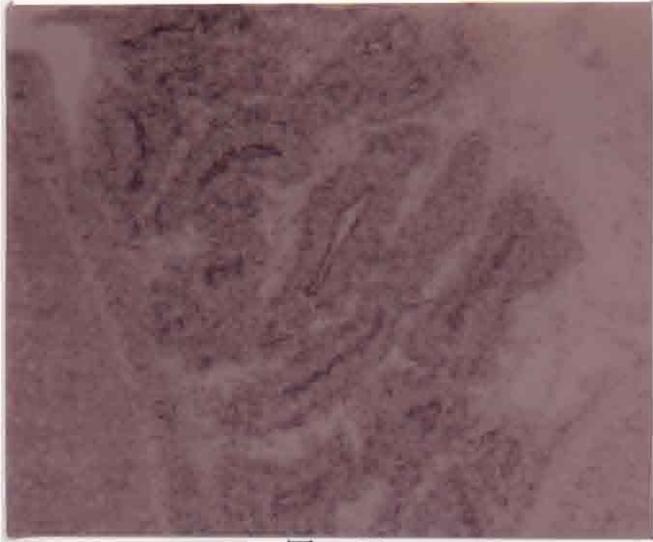
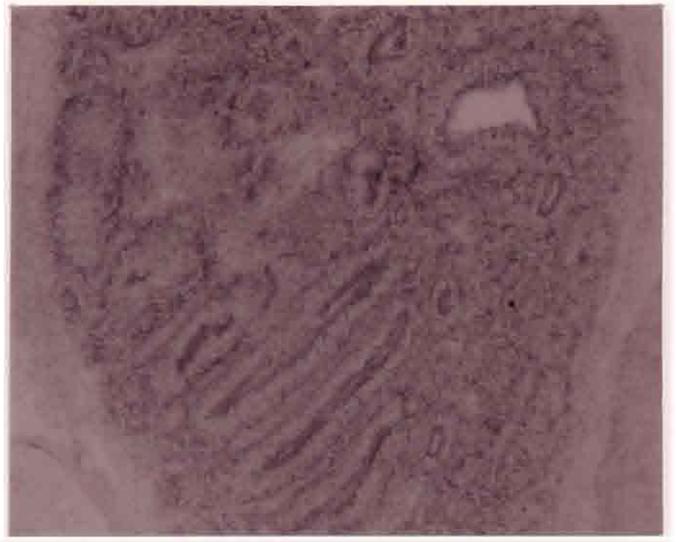


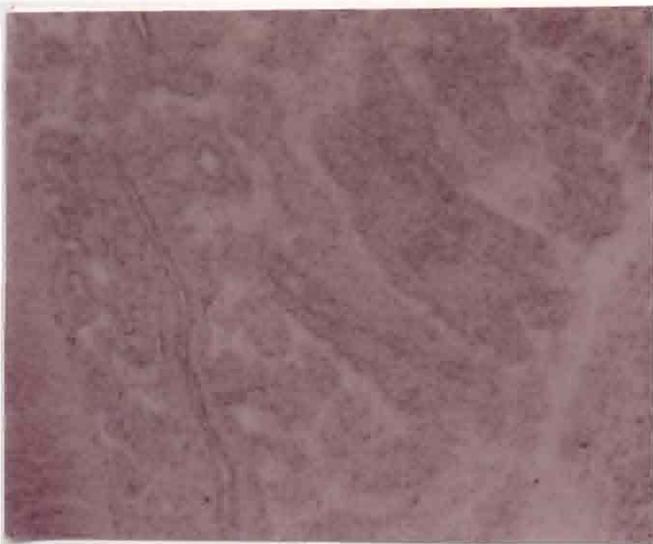
图 82



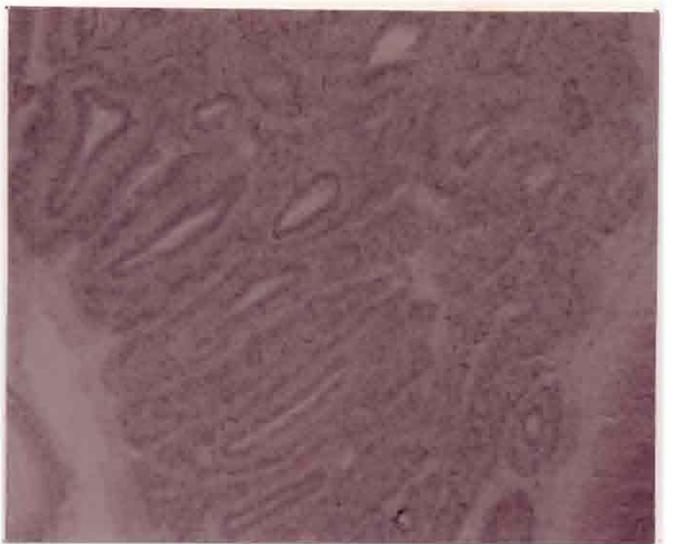
☒ 83



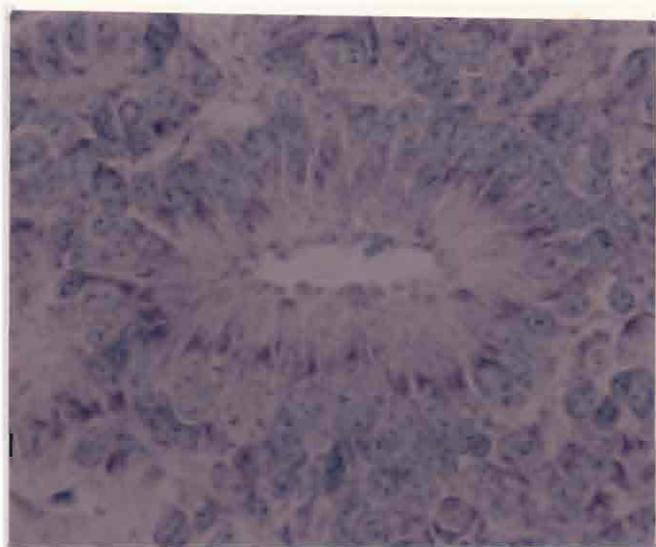
☒ 85



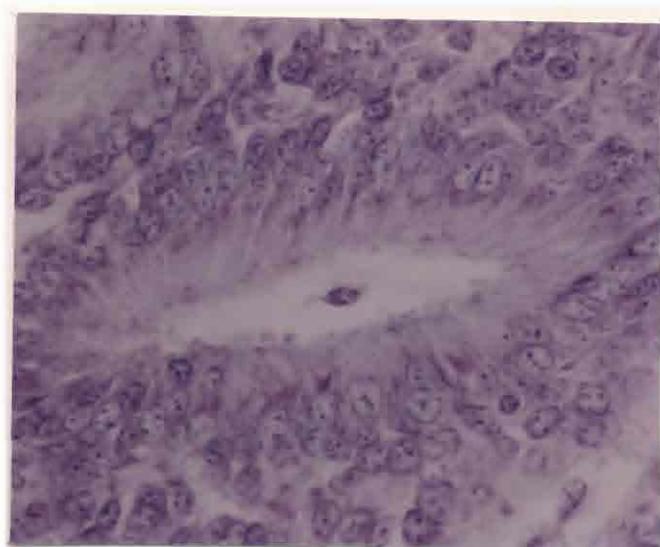
☒ 84



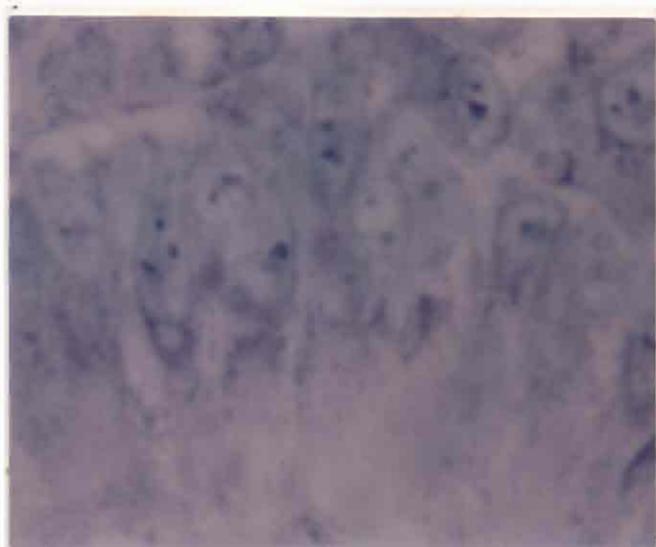
☒ 86



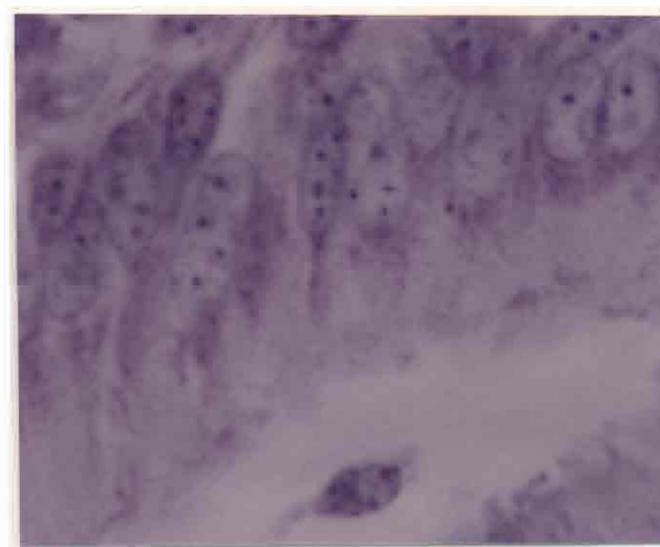
☒ 87



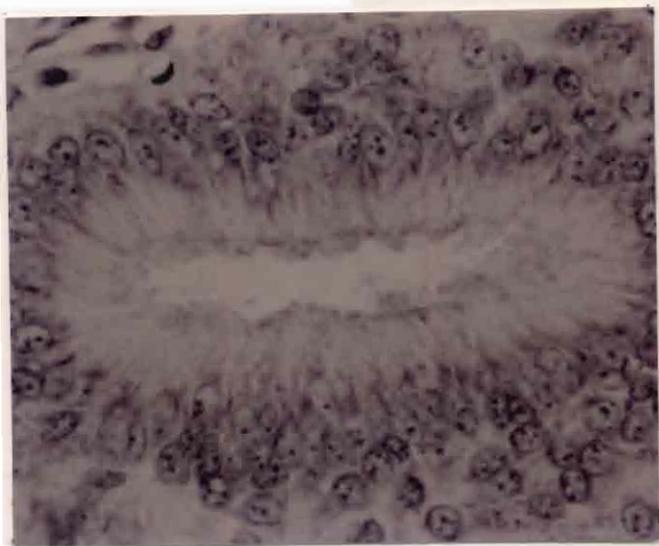
☒ 89



☒ 88



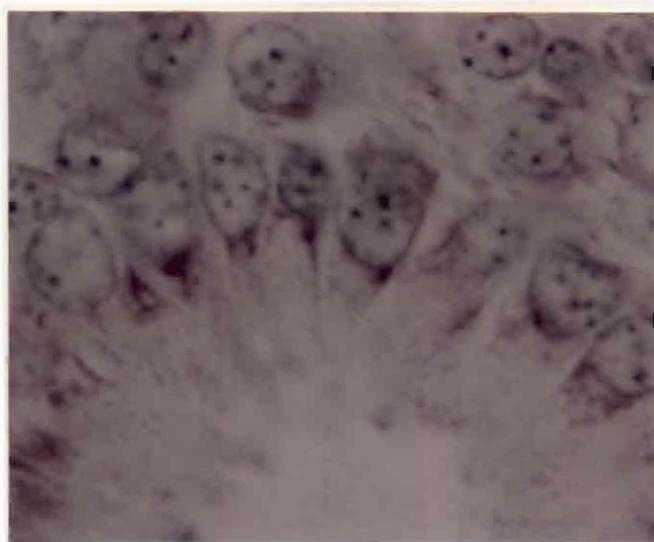
☒ 90



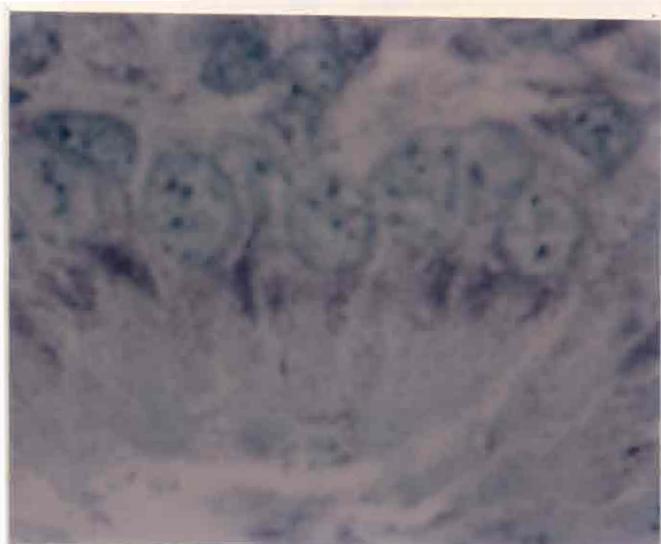
☒ 91



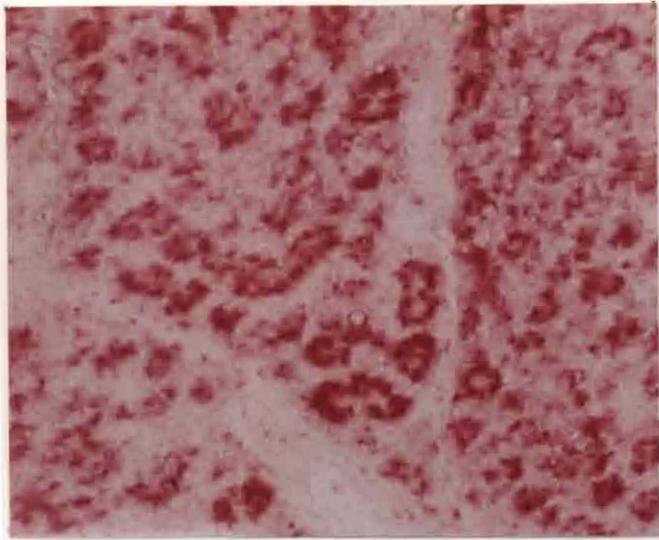
☒ 93



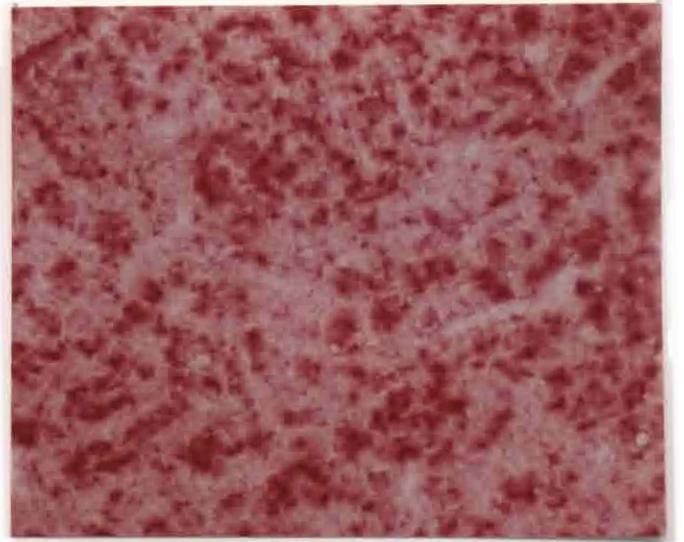
☒ 92



☒ 94



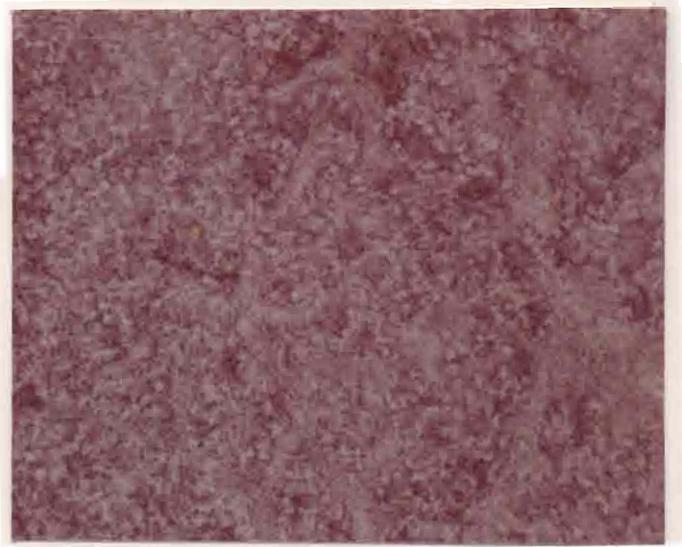
☒ 96



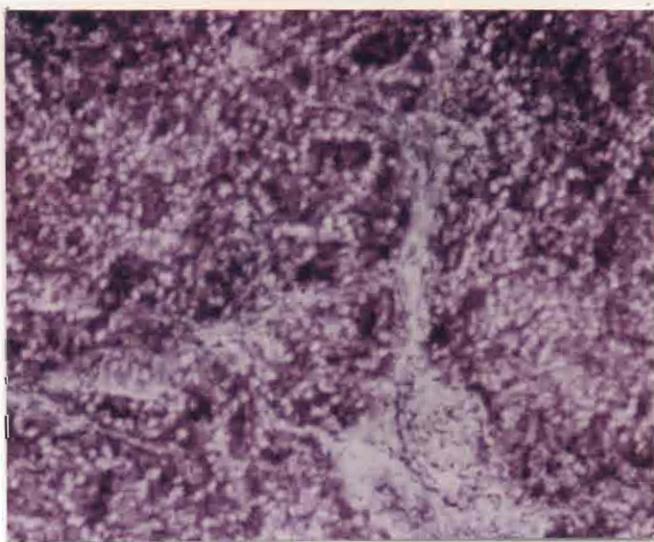
☒ 99



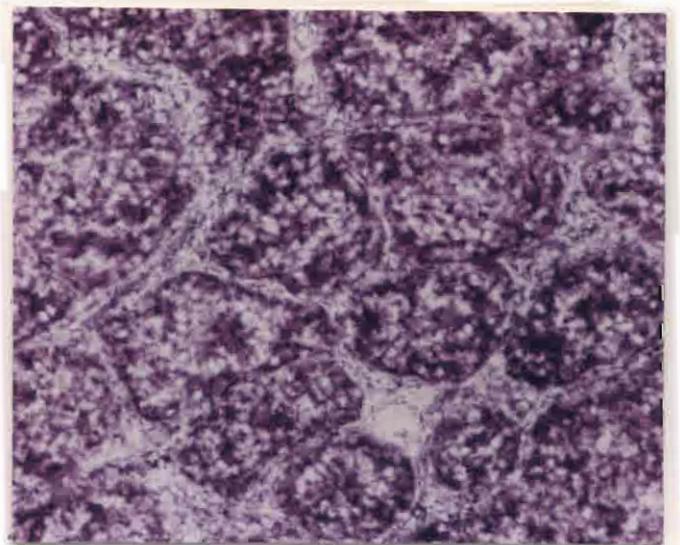
☒ 97



☒ 100



☒ 98



☒ 101

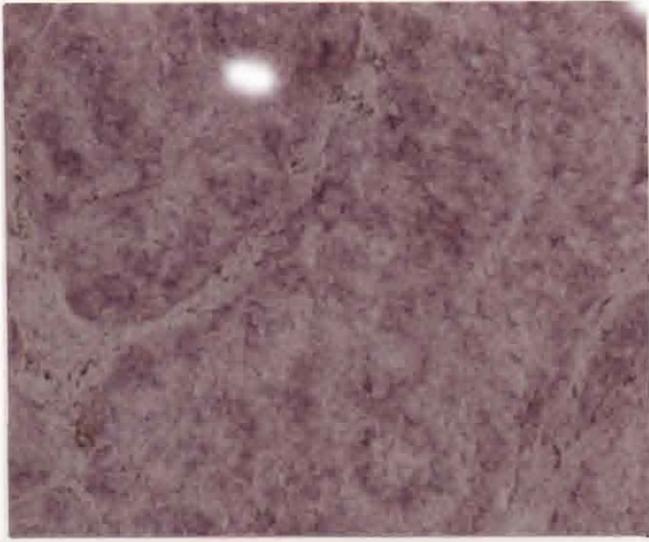


图 102

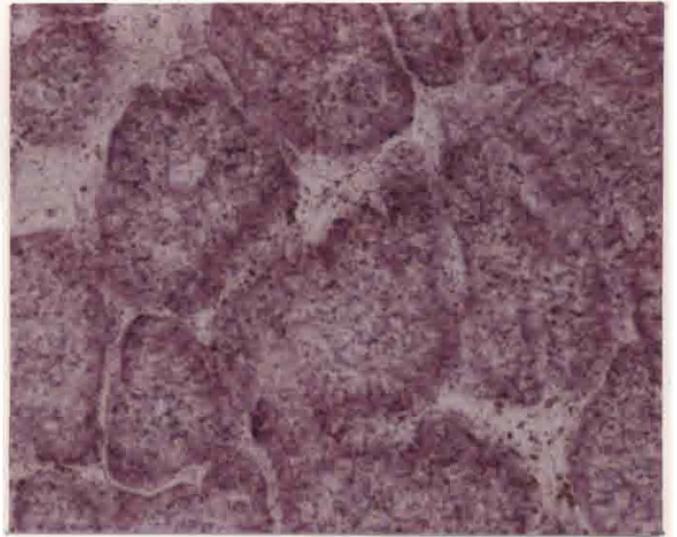


图 104

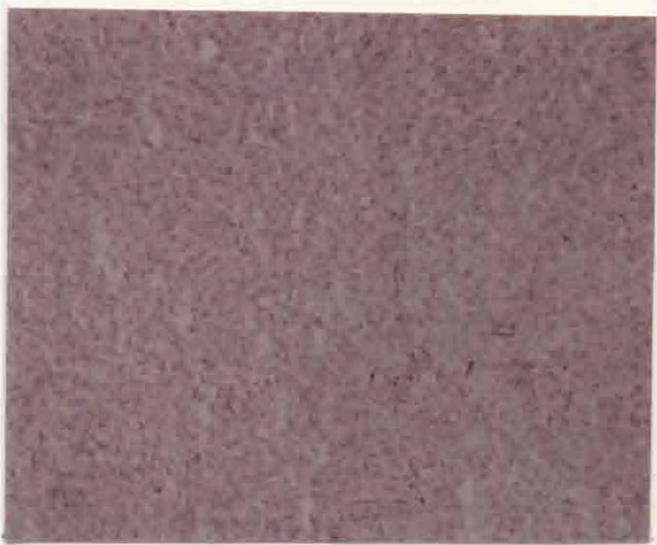


图 103

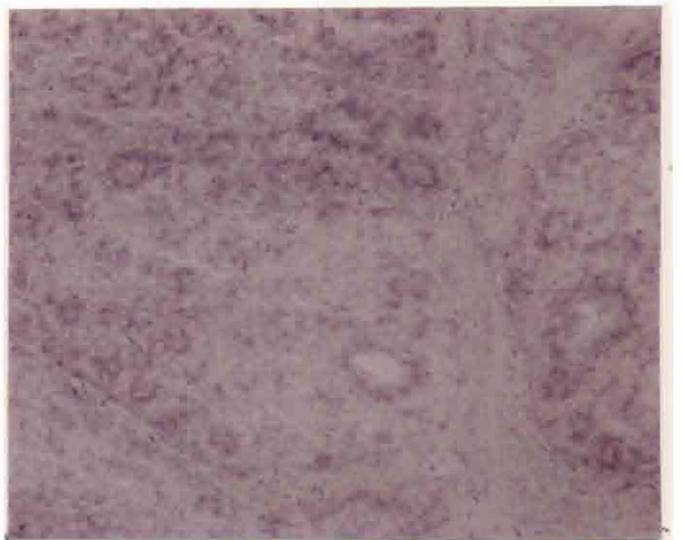


图 105