

立体構築による *Sepiolo atlantica* の網膜構造の研究

The structure analysis of a cuttlefish, *Sepiolo atlantica*, retina on the three dimension reconstruction

清 道 正 嗣

SEIDOU Masatsugu

概要

Sepiolo atlantica の網膜の視細胞外節層の厚みは、眼球腹側では $3.4 \times 10^2 \mu\text{m}$ 、背側では $2.4 \times 10^2 \mu\text{m}$ あった。切片から立体再構成した眼盃の形を検討することによって、この差が顕微鏡切片の作成過程に由来するアーティファクトでないことを明らかにした。

浅い海の海底付近で生活する *Sepiolo atlantica* の網膜腹側で肥厚した外節層が見つかったことは、頭足類外節層の厚さの増大が、その生物の瞳孔の形状から最も普通に使用していると単純に予想される網膜部位で起きるのではなく、その生物の生態にとって重要な部分で起きるという考えを支持している。

Abstract

The thickness of the outer segment layer in a cuttlefish, *Sepiolo atlantica*, retina was measured. It was $3.4 \times 10^2 \mu\text{m}$ on the ventral retina and $2.4 \times 10^2 \mu\text{m}$ on the dorsal one. The reconstructed image from the sections showed that the difference between them was not come from any artifact in the microscopic observation.

The thickened ventral retina was found in the eye of *S. atlantica*, which is a benthos in the shallow sea. This supports the idea that the thickening of a retina happens at the area where is useful and important for the behavior of the creature, rather than is mainly exposed with an incident ray from its pupil.

キーワード

adaptation, outer segment, photoreceptor, 視細胞, 頭足類, 適応, 光環境

はじめに

動物の眼球は、その生物の生態・生息環境と密接な関わりを持って進化してきた。その適応の仕方は、動物群によって様々である。頭足類と中深海性の魚類では、光環境への適応として、網膜が部分的に厚くなっていることが報告されている。この構造の解釈として、頭足類の場合は瞳孔の形状・注視する方向と関係があるとの報告がなされているが (Young et al. 1963)、中深海棲の魚類では捕食行動と生息場所の光環境に原因が求められている (Denton et al 1989)。以前行ったホタルイカとその近縁種の比較研究では、これら以外に同種間コミュニケーションの要素も関係していることを示唆した (Michinomae et al. 1994、清道・成田. 1993)。このタイプの適応の意味を正しく解釈するためには、他種との比較検討を広い範囲で進めることが必要不可欠である。

今回 *Sepiolo atlantica* (標準和名がないので、以下 *S. atlantica* を使う) を手に入れることができたので、このイカの網膜の立体構造について調べることにした。この研究では、顕微鏡切片標品画像からの網膜立体像の再構築や、パラフィンブロックの切断面の直接観察を生かす方法を検討した。

S. atlantica は、浅い海に棲む大西洋産のヒメダングイカの仲間である。昼間は砂泥質の海底に潜り、夜間活動する。海底に蹲る姿勢や横長の瞳孔の形などはタコ類に似ている。一方、体色が透明で発光器官を持つところは、発光するイカ類に共通の性質である。このような中間的な性質の生物を調べることは、生物の適応進化を考察することに有用である。

材料と方法

ホタルイカ (*Watasenia scintillans*) は、夜明け前に富山湾で定置網から生きたものを捕獲した。*S. atlantica* は、Scraggane 湾 (アイルランド、ケリー州) で、夜間生きたものを捕獲した。

両イカの眼球は、生きた状態で切り出した。眼球からレンズを取り除いた後、4℃の4%パラホルムアルデヒド海水で固定した。固定したサンプルを研究室に持ち帰った後、一晩水洗いし、アルコールシリーズ脱水し、パラフィンに包埋した。パラフィン包埋ブロックをトリミングした後、マイクロトーム (PR-50、大和光機株式会社) で6 μm厚の連続切片を得た。切片は脱脂の後、マイヤー・ヘマトキシレン染色液とエオシン染色液で二重染色した。

サンプルの撮影は、パラフィンブロックの断面と顕微鏡用スライド標品で行った。各撮影系の球面収差は、サンプル撮影と同条件で方眼紙を撮影し、得られた画像から評価した。

パラフィンブロックの断面は、マイクロトームで連続切片を作成中に、ブロックを正面からデジタルカメラ (PowerShot S3IS、キャノン株式会社) のスーパーマクロモードで撮影した。

スライド標品は、実体顕微鏡 (SZ-40、オリンパス株式会社) に、カメラアダプタ (NY2000S2、マイクロネット株式会社) を介してデジタルカメラ (C-5050Z、オリンパスイメージング株式会社) をつないで撮影した。

スライド標品断面像からの立体再構築には、立体再構築ソフト (DeltaViewer、奈良女子大学 DeltaViewerプロジェクトチーム) を用いた。

ホタルイカのみ、ギロチン法 (Hamanaka et al. 1994) によって網膜をスライスし、断面の観察を

行った。まず固定していない眼盃の開口部に、6本の切り込みを入れて切り開き、眼杯を平面化した。これをギロチンによって0.5-1mm間隔で平行に刻んだ後、その状態をカメラ（OM-1、オリンパス株式会社）で撮影した。得られた短冊状のサンプル全てを横倒しにし、断面を実体顕微鏡でひとつずつ写真撮影した。得られた画像上で視細胞外節の厚みを測定した。得られた厚みは平面化した眼杯の図上にマッピングし、厚みが同じ部分を線でつないで、等高線を引いた。

結果

今回計測に用いたホタルイカの外套長は、5.8cmであった。眼球の形状は、計測時には直径12.0mm・厚み5.5mmで、レンズ側から押しつぶされたような回転楕円形であった。これは、自重による変形で、以前の研究から実際には球形に近いことが分かっている。

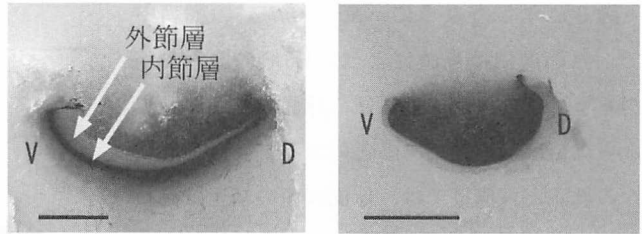


図1 包埋ブロックの断面

左：ホタルイカ、右：*S. atlantica*、球面収差は補正してある。
V：腹側、D：背側、バーは4mm。

今回計測に用いた *S. atlantica* は、外套長が2.1cm、眼球の形状は長軸7.8mm・短軸7.0mmの体軸方向に長い回転楕円体であった。眼球の瞳孔は、眼球長軸方向に長い角の丸い長方形で、長辺3.0mm・短辺1.0mmであった。

包埋ブロックの断面を直接撮影すると、図1に示したように、ホタルイカでは網膜視細胞外節層の厚みの部位による差異と共に、網膜腹側では視細胞外節層ごとに異なる着色が観察できた。一方 *S. atlantica* では、視細胞外節層に色素顆粒が多く、視細胞の外節層・内節層の区別や、外節層の色の判断は不可能であった。

切片の観察に用いた実体顕微鏡とカメラを合わせたレンズ系で得られた画像は、球面収差により中心部に比べて周辺部が小さくなる歪みがあった。歪みの量は、水平方向では最外部が中心部の95%、垂直方向では96%になる程度であった。これらは今回の計測では問題にならない量であったので、歪みの補正は行わなかった。

ホタルイカ網膜切片より、背側視細胞外節層の厚みを測り、 $1.5 \times 10^2 \mu\text{m}$ の値を得た。これは、ギロチン法で得た図2の背側部分の厚みと一致した。

S. atlantica 連続切片の観察中に、網膜の部位により視細胞外節層の厚みが非対称に異なっている一連の像が見つかった。図3は、連続切片中のほぼ中央の位置にあたるものである。この写真では、外節層の厚みは、Aでは $3.4 \times 10^2 \mu\text{m}$ 、B・Cでは $2.4 \times 10^2 \mu\text{m}$ 、であった。a付近

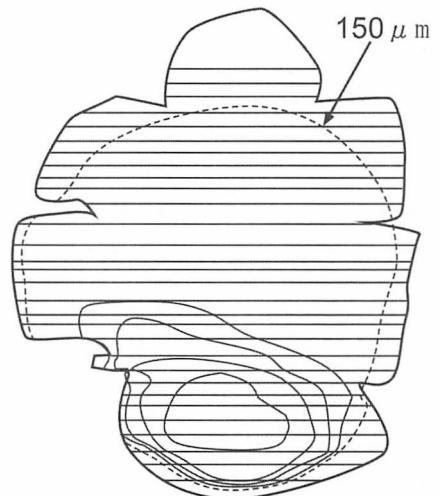


図2 ホタルイカ網膜視細胞外節層の厚み

で網膜の厚みの急速な変化が見られた。

連続切片を再構築し、図4を得た。腹側に包埋の際できたと思われる広いくぼみがあることが分かった。

考察

図3に示したように、*S. atlantica* の網膜中で、外節層には位置によって1.5倍の厚みの差があった。これは、撮影系の球面収差が問題にならないほどの差であるといえる。よって、切片の計測と再構築では、球面収差の補正は行わないことにした。またホタルイカの切片による計測とギロチン法による計測から、固定・脱水・包埋による影響はこの測定スケールと精度では問題にならないので、計測値をそのまま以下の考察で用いることにする。

顕微鏡切片像から元の立体物の形状やサイズを単純に推測することは、一般に危険である。そこで*S. atlantica* で観察された視細胞外節層の厚みの違いが、実際に眼球中に存在するものなのか、あるいはアーティファクトであるかを以下のように検討した。

図5aに示すように、中空の球体及びその一部をスライスして断面を観察した場合、球殻部分の厚みは、球体表面の法線を含む面で切った場合(2-2')が最小となり、それ以外の方向(1-1')では、切断箇所の法線方向からの切断面の傾きに応じて厚く見える。この場合、厚みの変化は断面中の全ての場所で一様に起きる。従って、仮にこのような形の眼球で、局所的な見かけの厚みの違いが見つければ、それは実際の厚みの違いを反映していると言える。

球形の眼球や眼杯は自重によってたわんで、図5bのような回転楕円体となりがちである。このような場合、図5b左側二列の図のように切断面が回転体の軸に平行であれば、殻部分の厚みはaの場合と同じ性質を示す。しかし、3-3'、4-4'のように切断面が傾くと、切断面の傾斜方向で殻の厚みは非対称になり、その見かけの厚みの増大量は、法線からの傾きに比例する。このような非対称

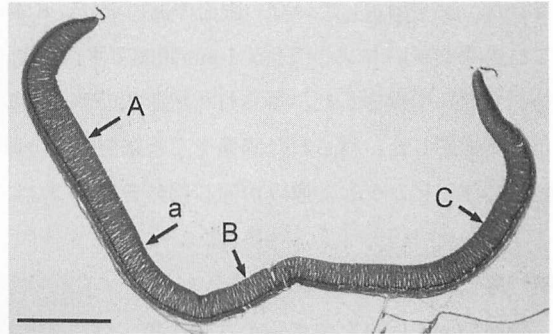


図3 *S. atlantica* の網膜断面
バーは1mm

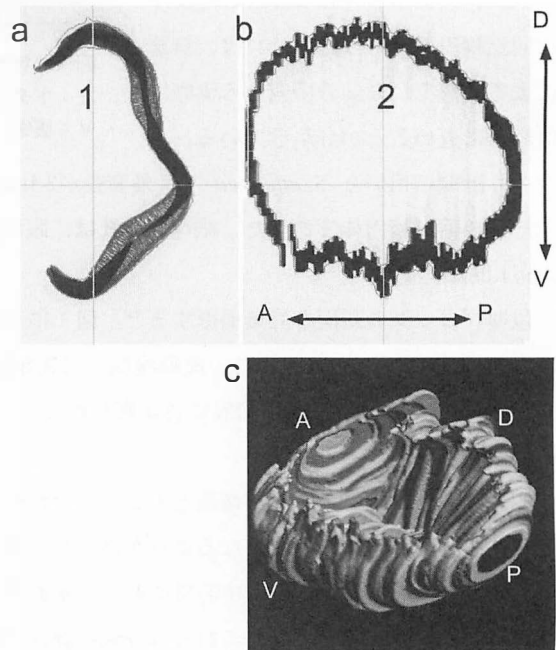


図4 *S. atlantica* 顕微鏡切片からの再構築
a : 再構築した網膜の垂直断面 (b図の線2近辺)
b : 再構築した網膜の水平断面 (a図の線1近辺)
c : 立体構築した網膜
D : 背側、V : 腹側、
A : 前側 (足側)、P : 後側 (胴体側)

は、切片の向きを平行に保って楕円体の中心を超えて切り進むと、3と4'、3'と4のように必ず対称な位置で逆の非対称を示すことが図から分かる。

S. atlantica 眼球のように回転楕円体の場合、前述の他、図5cの5-5'、6-6'に示したように、楕円体の長軸（回転軸）に垂直な方向からずれた場合には、どの切断面でも厚みの非対称な増減が起きる。この非対称性は、前述の3-3'、4-4'の例と同様の対称性を持つ。しかし、*S. atlantica* 眼球切片では、この対称性が観察されなかったため、観察された結果が、切片作成時のスライス方向によるアーティファクトでないと結論できる。

このほかに、断面図の外節層の厚みを非対称に見せる原因には、部分的な眼球の変形が考えられる。図5dのように眼球の一部にくぼみがあると、その部分をかすめるように切片ができた場合（7-7'、8-8'）に、見かけの厚みが著しく増大する。眼球の形状を立体再構築した図4上で、当該切片の位置とその周囲の眼球の形状を確認することによって、今回この可能性は否定できた。

本研究を行う前には、*S. atlantica* は底棲性の傾向が強く、瞳孔がタコ的な角の丸い長方形であることから、Young (Young et al. 1963) がタコで報告しているように、眼球のレンズ正面にある視細胞外節層が肥厚していると予想していた。しかしながら結果は、ホタルイカ腹側網膜 (Michinomae et al. 1994、清道・成田, 1993) や Denton (Denton et al 1989) が報告している深海性魚類のように、その生物にとって重要な視覚情報が得られると思われる網膜上の位置に、特異的な視細胞外節層の肥厚が起きていることを示していた。このことは、*S. atlantica* が夜行性であり海底に住むため、光の少ない状況で海面方向を見る必要があるという点で、ホタルイカや深海性魚類と同じ要求が視覚系に生じたことによる適応であると解釈できる。このことは、ホタルイカ眼の進化適応を考える上で、一つのヒントとなるであろう。

視細胞外節層の厚み計測に用いるサンプル作成には、いつでも網膜表面に対して垂直方向の断面が得られるギロチンの使用が最も適している。しかしながら、ギロチンを使う方法には、対象が薄い平面に限るという制約がある。ホタルイカやホタルイカモドキのように、網膜の厚みに対して眼球の大きさが適当なサイズでなければ、この条件を満たすことは難しい。小さな眼では、眼球の直径に対して相対的に網膜の厚みが厚くなり、眼球を平面に開くことが困難になる。つまり網膜の裏表で表

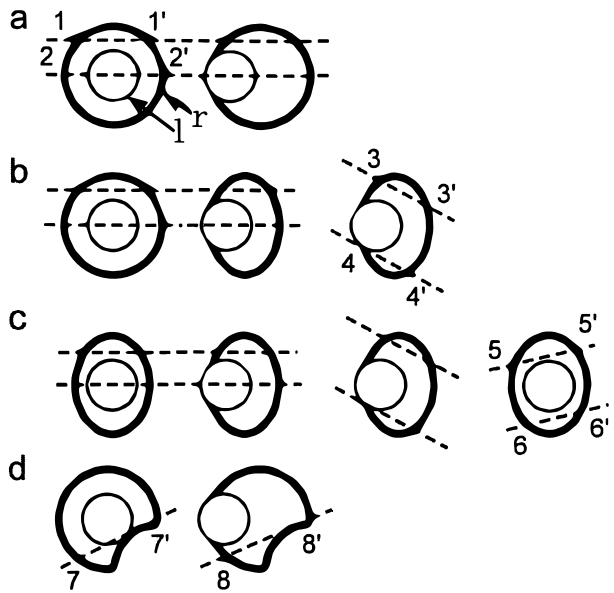


図5 眼球の形状に切片の方向が及ぼす影響
左列はレンズ方向から、左から二列目は真横から見た図。
破線は切断面を示す。
l : レンズ、 r : 網膜

面の長さの違いが大きいため、開いた網膜がスプーン状に反った状態に戻ってしまうのである。

S. atlantica の眼球は、網膜の厚みが約300 μ m、直径は8 mm程度で、平面に伸ばすことができなかった。このため通常の光学顕微鏡切片を作ったが、この方法では、包埋物質の固化化時の不均一な力の発生によるサンプルの変形、トリミング時に正確なオリエンテーションが不可能であること、網膜表面に垂直な切片がどれであるかの判別が難しいことなど問題が多い。今回の実験は、目的が限定的であれば、眼球の形状からの思考実験と切片からの立体再構築によって、この欠点を補うことができることを示している。

ホタルイカでは、パラフィンブロック断面で異なる視物質退色産物に基づく色の違いを確認することができた。通常の光学顕微鏡切片作成の過程では、脱水（疎水化）処理と脱脂（親水化）処理を行うため、タンパク質の変性が起きると同時に、低分子量の脂溶性・親水性両方の物質が失われやすい。このため、着色の原因となる物質の多くが失われてしまい、微妙な色の違いを観察できることは少ない。これに対して、包埋ブロックの状態では、疎水化処理だけしか行わないので、この点に関してより穏和な条件であると言える。これに加えてブロック中のサンプルには、切片に比べて格段に厚みがあることから、色の観察が容易になったと思われる。

このことは、層状に分化した網膜を検索する際に、固定したサンプルの切片標品のみならず、ブロック側も観察することが有効であることを示している。しかしながら *S. atlantica* の場合では、他の浅い海に棲む頭足類同様に外節層に色素顆粒が多く、視物質に由来する色を観察することはできなかった。パラフィンブロック断面の色を直接観察する技法の適応範囲は、ギロチン法同様に視細胞外節に色素顆粒の少ない中深海性の頭足類に限られるようである。

謝 辞

四方漁港の皆さんには、ホタルイカの入手のために船に同乗させていただき、定置網から生きたホタルイカを捕獲させていただいた。Cork大学の Dr. J. Davenport には、アイルランドで実験用薬品の入手を助けていただいた。Bristol大学の Dr. J. Partridge には、*S. atlantica* の捕獲に都合の良い場所を教えていただいた。Waterworld の Mr. & Mrs. Fitzgibbon とスタッフには、*S. atlantica* 捕獲に骨を折っていただいた。これらの方々に、心から感謝します。

この研究は、2005年度愛知県立芸術大学学長教員特別研究費によってなされた。

参考文献

- ・ Denton, E. J. (1989) *J. Mar. Biol. Ass. U. K.*, **69**, 409-435.
- ・ Michinomae, M. et al., (1994) *J. Exp. Biol.*, **193**, 1-12.
- ・ 清道正嗣 成田欣也, (1993) 生物物理, **33**, 207-211.
- ・ Hamanaka, T. et al., (1994) *J. Mol. Biol.*, **238**, 139-144.
- ・ Young, J. Z., (1963) *Proc. Zool. Soc. London*, **140**, 255-283.