網膜移動反応利用による斃死魚の死亡時間帯の推定

関野 清成・斎藤 健・西山 寛・狩谷 貞二

(1973 年 12 月 20 日受理)

A Method to Estimate the Time of Death in Fish
by Retino-motor ResponseKiyonari SEKINO*¹ Takashi SAITO,*² Hiroshi NISHIYAMA*²
and Teiji KARIYA*²

If a response with a prominent diurnal rhythm in fish body ceases its cycle just when the fish died and does not change for a reasonable period, it may be possible to estimate the time of death by observing the phase of that response of the dead fish.

Attempts were made to use the retino-motor response of fish for this estimation. To find the characters of the retina in every phase, the position of the cone, the width of the pigment layer and the state of the pigment were observed, and the illuminance was measured. The characters of the retina in the daytime, at the dusk, at night and at the dawn were defined respectively. The retina kept the light-adapted state when the illuminance was more than five lux. Generally the state of the retina did not change for twelve hours after death even in such a high water temperature as in summer.

Therefore, when dead fish are obtained from the common pond, river and sea, to observe their retina and compare it with the four characters is useful for the estimation of the period of time in which the fish died.

自然界にすむ魚が一時に大量斃死する現象は昔からよく知られているが、最近人間社会の発達につれて産業排水や生活排水がふえ、これらが河川等を汚染して一次的或は二次的にその魚を多量に殺す例が多くなり、大きな社会問題となつている。これらの水界に立脚している水産の立場としてはこの汚染を防ぐ対策を考えなければならないが、この斃死を起した真の原因がわからなければ根本的な解決は望めない。直接の死因となる汚染物質の判定には狩谷等¹⁻⁴⁾の研究が発表されているが、これらの方法では汚染物質の起源をつきとめるには不十分である。即ちいつ頃この死亡が起つたかを知ることが起源の追求には大きな手掛りとなるのであるが、上記の研究では魚の死亡時刻は判定できない。一般に動物の死亡時刻の推定は、屍体の経時変化を知り逆算してその死亡時刻を推定する方法がとられている。魚では死後硬直の状態や、揮発性塩基性物質、水溶性蛋白質の定量等から逆算する試みもあつたが、魚種、死因、物理的環境条件等の影響が複雑で、実際の死亡時刻の推定には殆んど利用されていない。これらの方法とは別に、生体内の現象で日周変化があり、死亡した時にその状態がそのまま固定され、時間経過に伴う変化の少ないものがあれば、屍体のその現象の状態を知ることによつてその動物の死んだ時刻が判定できるわけである。魚の場合普通河川等で起つた斃死魚は死後遅くとも 15 時間以内には発見される例が多いから、この程度の時間原形を保つ現象であればよい。

以上の観点から正確な時刻までは無理としても、死亡の起つた時間帯の推定に役立てたいと考えて魚の網膜移動の現象をとりあげて本研究を実施した。

*¹ 東北大学農学部付属水産実験所 (Marine Fisheries Laboratory, Faculty of Agri., Tohoku Univ., Onagawa, Miyagi, Japan.)

*² 東北大学農学部水産学科 (Dept. of Fishery, Faculty of Agri., Tohoku Univ., Sendai, Japan.)

実験方法

実験に使った魚は、ニジマス (*Salmo gairdnerii irideus*), ウグイ (*Triborodon hakonensis hakonensis*), コイ (*Cyprinus carpio*), マサバ (*Scomber japonicus*), メジナ (*Girella punctata*), メバル (*Sebastes inermis*), マハゼ (*Acanthogobius flavimanus*)* である。日周変化を調べるため自然光のみを光源として水槽で飼育し、日没時と日出時を重点的に連続して魚を殺し眼球を固定した。殺し方は頭部切断後脳の破壊, 200 ppm の PCP 海水溶液に入れる, 50°C の温海水に投込む等の方法を取り, 約 10 分後大型のものは眼球をとり出して角膜を切開き, 小型のものは頭の一部ごと SUSA 液で固定, パラフィン法で眼球の中央部を水平に 4-7 μ

Fig. 1. Diagrammatic figure of visual cell layer of a black rock-fish (*Sebastes inermis*) in the dark- and light-adapted state, and measurements made are shown. P, width of pigment layer; C, distance from pigment epithelium to ellipsoid; T, width of visual cell layer. p.e., pigment epithelium; c., cone; o.s., outer segment; e., ellipsoid; e.l.m., external limiting membrane; o.n.l., outer nuclear layer.

に切り, MAYER の酸性ヘマラウム, エオシン染色をして検鏡測定した。測定方法は, KOBAYASHI⁵⁾ と BLAXTER⁶⁾ の方法を参考にして Fig. 1 のように色素上皮層外端から外限膜迄を視細胞層の幅として T, 同じく色素上皮層外端から色素顆粒の内側突起迄を色素顆粒分布の幅として P, 色素上皮層外端から錐体の楕円体と外節との境迄を C として眼底の中央付近を 10 所測定し, それぞれの指数を求めた。即ち,

$$\text{Pigment index} = 100 (\text{mean } P / \text{mean } T)$$

$$\text{Cone index} = 100 (\text{mean } C / \text{mean } T)$$

である。

照度の測定は東芝製の極微照度計 PI-2 型と, それを基準にして自作した CdS 導電セル利用の照度計である。この実験に使った魚はいずれも 1 年魚以下のもので, 飼育水温の範囲はウグイ, マハゼ, メジナ, コイでは 20°-24°C, 他は 10°-15°C であつた。

又この判定法が適用できる地形の条件を知るため, 模型的な横穴の照度分布を測定した。

結果および考察

網膜の時間帯による特徴 Plate I はマサバの網膜である。昼間は色素顆粒は幅広く分布しているが内側に偏り, 外側にはほとんど存在していない。夕方はこの色素顆粒が全体に外側に移動し, 更にはその分布の幅が狭くなり錐体との間にすきまを生ずる。夜間は色素顆粒は外側に密集し, 錐体のミオイドはいつばいに伸びている。明方になると錐体のミオイドは縮み, 外側に密集している色素顆粒層から突起が出て縞状になり錐体の位置に迄達している。以上の 4 相の時間帯による網膜の状態の特徴はこのように色素顆粒の分布にもつともよく現れ, 例えばコイやメバルでは明方に色素顆粒の分布の幅は拡がるのに, その密度は中央ではまばらであるというぐあいにそれぞれの特徴はあるが, 全体としては同じような傾向を示した。

各魚種の網膜移動の日周変化 自然光による地表の照度は, 季節, 天候, 月令等によつてその値が変動するが日周変化の型は変わらず Fig. 2 のようになっている。Fig. 3 には各魚種の網膜移動の状態を時刻別にとらえ, 前述の指数によつて示した。各魚種とし明順応から暗順応に移行するには色素顆粒の移動が先行している。その時の照度は 1~数 lx と考えてよい。(マサバは屋根のある水槽で飼つたのでこの場の照度実測

* 和名, 学名はすべて松原喜代松 (1955): 「魚類の形態と検索」に従つた。

値は 16 時 30 分で 6.8 lx であった。又マハゼは室内水槽で飼ったので実照度はかなり低くなつていゝと考えられる)。KOBAYASHI⁵⁾の実験によればマアジでは暗順応のものが完全に明順応になるのに 5 lx 程度の照度を必要としている。この数値は今回の実験の数値とはほぼ同じである点は興味深いものがあるが、網膜移動反応を起させる刺激が或一定の照度の絶対値であるか、或は照度変化の度合であるのかは今後の詳細な実験を要するところである。

暗順応の時の指数を見ると、特にウグイでは錐体がほとんど動いていないという顕著な事実があつた。

次に暗順応から明順応への移行についてであるが、照度変化の認め難い日出の 2~3

Fig. 2. A variation of illuminance on the ground by the skylight from the dusk to dawn. Arrow mark refers to the time of the sunset or the sunrise. The age of the moon was 29.

Fig. 3. The migration of pigment and cone of retina from the dusk to dawn. Arrow mark refers to the time of the sunset or the sunrise. Each point refers to one fish. x, pigment index; o, cone index.

時間前から既に錐体や色素顆粒が動きはじめている現象がコイ、サバ、ウグイで見られた。この現象は田村⁷⁾の「スズキ、コイでは照度変化がなくても後半夜に明順応移行をはじめた。」という結果と一致している。この現象は体内時計的なものの存在を考えないと説明がつかないので今後の研究にまわしたい。さりながらこれらの結果と色素顆粒の分布の様式とから、夕方(日没前から日没後約3時間)、夜間(日没後3時間から日出前3時間)、明方(日出前3時間から日出後約1時間)、日中(日出後1時間から日没前迄)の4時間帯に分けることができた。

死後の網膜の変化 メジナ、ニジマス、コイを明るい水槽に入れて3時間置き、一度に数尾を50°Cの湯で殺し、1尾は死亡時の網膜の状態を見るために直ちに固定し、残りは死んだまま元の水槽に戻し時間経過に伴って1尾づつ眼球を固定した。又この逆に暗室に入れたものを殺して時間経過による網膜の状態の変化を見た。この死亡直後に固定したものと12時間放置したものの網膜の比較をTable 1に示した。メジナ

Table 1. The migration of pigment and cone after death

Kind of fish	Indices	Light phase		Dark phase		W.T.
		Fixed just died	Fixed 12 hr. after death	Fixed just died	Fixed 12 hr. after death	
<i>G. punctata</i>	Pigment	83	83	38	41	23°C
	Cone	81	79	40	37	
<i>S. gairdnerii</i>	Pigment	82	84	44	38	23°C
	Cone	73	71	36	30	
<i>C. carpio</i>	Pigment	84	64	42	67	20°C
	Cone	79	70	48	63	

とニジマスでは明順応の場合も暗順応の場合も12時間後でも網膜の状態に変化は起つていなかった。しかしコイの場合はPigment indexでは65%前後に収れんし、Cone indexも僅かであるが移動していたのが見られた。暗室で殺したコイは12時間後に色素顆粒の分布の幅が広がり、明室で殺したものは色素顆粒層の幅が収縮したのであるが、前者は色素顆粒層の中間に空白部分が散在しているので両者を見分けることはできた。メジナでは死後12時間放置したものは腐臭が感じられたが、網膜には大きな変化がなく測定は容易であった。魚種による死後の変化については更に吟味する必要は残っているが、コイのように生命力が強いといわれている魚でも少くとも日中に死んだか、夜間に死んだかの判定は可能であり、一般には前述の4

つの死亡時間帯の判定に網膜移動反応を利用することはであると考える。

この方法の適用される立地的範囲 若し水中に横穴があり、その中の照度が昼間充分になればそこにかくれている魚の網膜には移動反応が起らず、従つてこの魚が死んだ時屍体の網膜を調べても死亡時間帯の推定はできない。この判定法の適用範囲を知るため、横穴の模型的なものとして直径9 cm、長さ190 cmで内面が均一に錆びた鉄板の筒の内部の照度分布を測定した。その結果がFig. 4である。空中での測定からA, B, Cの曲線が得られた。この筒を黄濁した透明度90 cmの海水中に水平に置いた時の筒口と奥の照度の測定値を×で示した。水中も空中も媒体が均一で

Fig. 4. The distribution of illuminance in an iron tube (9 cm in diameter) placed horizontally. A, B, C, in the air; D, E, estimated curve in muddy sea water of which transparency was 90 cm.

あれば照度の減衰の様式は同じと考えて図中の D, E 両線が得られる。この E 線からみて筒の奥 50 cm の所が 5 lx 以上の明るさであるためには筒口での水平照度は約 300 lx 以上なければならない。実際にこの時の海中 5 m 深度での水平照度は方角によつて変化はするが平均すると約 400 lx であつた。以上の諸点を綜合して、河や池の水色、広さ、天候、透明度等にもよるが、少くとも深さ 5 m の所に径 9 cm の横穴があり、その奥 50 cm の所に魚がいる場合、そこの照度は 5 lx 以上になるからその魚の網膜には明暗順応の日周変化が起るであろう。その日周変化は普通の場合における日周変化に較べて時間のずれは予想される。しかし実際の河や池での魚の生態の観察によれば、そのように暗い所を好む魚でも穴の入口近くに頭を出しているのが普通で、穴の奥の方にいるのは特殊な場合である。

以上の諸結果から、この判定法は一般の河川等で斃死が起つた場合、その死亡した時間帯を推定することに有効であると考えられる。

文 献

- 1) 狩谷貞二・島津康右・芳賀克子：水産増殖，7(1)，46-53 (1959).
- 2) 狩谷貞二・島津康右・芳賀克子：同誌，7(2)，41-47 (1959).
- 3) 狩谷貞二・芳賀克子・芳賀秀雄・津田 勉：本誌，33，818-824 (1967).
- 4) 狩谷貞二・川瀬邦昭・芳賀秀雄・津田 勉：同誌，34，385-390 (1968).
- 5) H. KOBAYASHI: *J. Shimonoseki College of Fisheries*, 7, 169-177 (1957).
- 6) J. H. S. BLAXTER and M. P. JONES: *J. Mar. Biol. Ass.*, 46, 677-697 (1967).
- 7) 田村 保：本誌，22，742-746 (1957).

Explanation of the plate

Plate I. The retina of mackerel (*Scomber japonicus*) in every four phases in a day.

- A, daytime (5, Dec., 3.30 p.m., 400 lx). The pigments are distributed widely but less in the outer part of the visual layer.
 - B, dusk (5, Dec., 4.30 p.m., 1 lx). The distribution of the pigment moves outward collectively. A gap grows between cones and pigments.
 - C, night (5, Dec., 6.00 p.m., 0.0006 lx). The pigments are concentrated in the outer part of the layer, and the cones move outward, too.
 - D, dawn (20, Dec., 7.30 a.m. about 5 lx in the room). The cones have come back to inside already. The main part of the pigment still remains in the outer part but stretches process to inward.
- p.e., pigment epithelium; c., cone; e.l.m., external limiting membrane.