

学 位 論 文 題 名

河川遡上期におけるニホンウナギの性分化機構に関する研究

学位論文内容の要旨

ニホンウナギ *Anguilla japonica* は日本をはじめアジア各地で広く養殖が行なわれている重要な産業魚種であるが、養殖用種苗はすべて天然のシラスウナギに依存している。また、種苗の安定確保を目的とした種苗生産研究も天然の下りウナギを使用してきたため、計画的な研究を実施する上での制約が生じ、その技術の確立は未だになされていない。このような背景から、近年、養殖ウナギを種苗生産用親魚として使用する試みがなされている。しかし、養殖環境下で成長したウナギの大多数の個体は雄に分化することから、養殖魚を親魚とする場合、雌を大量に確保することは困難である。このような本種の種苗生産用親魚の安定供給を図る上でも養殖ウナギの生殖腺の分化と発達およびそれらの制御に関する基礎的知見が必要である。

脊椎動物において魚類は極めて多様な性の表現型をしめすことが知られている。魚類の性は基本的に遺伝的支配を受けているが、性分化の過程においてなんらかの外部要因により性の表現型が変化する事実が多数報告されている。これまで、人為的環境下で成長したウナギの性比は、極端に雄へ偏ることが示されている。一方、天然ウナギの個体群では、雌雄比に大きな偏りが無い。あるいは近年、雌ウナギの出現率が雄のそれより高いことが報告されている。しかし、性比が極端に一方の性へ偏る原因は不明であり、未だに性決定環境因子の実証ならびに性分化機構の解明はなされていない。

本研究では、ニホンウナギの性分化機構を解明することを目的として、養殖環境下で飼育されたウナギの生殖腺の性分化過程を形態学的手法を用いて明らかにするとともに行動生態学および内分泌学的観点からウナギの性分化に及ぼす外部環境因子の影響の実験的解析を行なった。

はじめに、ニホンウナギの性決定期に一致する河川遡上期の基本的な行動なら

びに生態を観察し、これらの生態特性が性決定に関与する可能性について検討した。河川遡上期の体長7cmのシラス期から体長20cmの黄ウナギ期の成長段階における種々の行動観察より、集団で河口域に蟄集したシラスウナギは黄ウナギへの変態が完了する段階で単独行動型に変化し、夜間河川を遡上しながら体長12cmから16cmに達する成長段階までに、生活の根拠となる隠れ穴を確保して独居生活をはじめるとされる。この時期は性分化が生じる段階と重なることから、ウナギは独居生活を営む河川定着時に生息環境の何らかの影響を受けて性が決定する機構を備えていることが推察される。

飼育環境下のニホンウナギの生殖腺の形態的性分化は体長15-23cmの個体で起こり、その80%以上の個体の生殖腺は精巣に分化し、他の個体は雌雄同体（6～21%）と少数の卵巢（5%以下）に分化した。精巣分化は体長18-23cmの個体でみられ、生殖細胞の緩やかな増加と結合組織の発達に伴う基質体細胞の顕著な増殖発達を特徴とした。一方、卵巢分化は生殖細胞の早期の減数分裂像を特徴とし体長15cm以上の個体でみられた。しかしながら、飼育群によっては体長15～22cmの未分化個体の約30%が生殖細胞の早期減数分裂像を示しながら、分化した個体群には完全な卵巢を有する雌はみられず、少数の雌雄同体と多数の雄の出現が認められた。従って、ニホンウナギの一部は幼時雌雄同体を経た後、雌雄に分化する未分化型雌雄異体種であることが示唆される。

上記の生殖腺の分化過程の観察結果を基にエストロゲンを経口投与し、効果的性統御技法の検討を行なうとともに、雌化誘導可能なホルモン感受期の特定により精巣分化の開始時期を形態学的、生理学的に解析した。ニホンウナギの性転換には天然のエストロゲンであるエストラジオール-17 β (E₂) が有効であり、25～75 mg/kg餌料の比較的広い濃度範囲で95-100%の雌化が誘起された。しかしながら、50mg/kg以上の高濃度処理群は筋肉中の脂肪含量の増加と肝臓の肥大を招くため、処理濃度の影響を考慮する必要がある。完全かつ機能的な性転換を導くためには、生殖腺の形態的性分化開始（体長15cm）よりも前の時期から性分化完了時（体長20cm）、すなわち、生殖腺の生理的性分化期と形態的性分化期の双方を通じて処理を施す必要性を示している。さらに、生殖腺の形態学的観察とホルモン処理の結果から、ニホンウナギの性分化開始の臨界期は体長11cm（ホルモン処理開始時期）から体長15cm（精巣分化の開始）の間に存在することが示唆される。

生殖腺の性分化に内因性ステロイドホルモンが性決定誘導物質として働いているかを明らかにするため、ウナギの精巢分化過程における血中の性ステロイドホルモン量を測定し、ステロイドホルモン産生細胞（ライディッヒ細胞）が精巢分化過程の何れの時期より分化し、しかもステロイドホルモン産生能を有するのかを微細構造学的に調べた。精巢分化に伴ってエストラジオール- 17β および11-ケトテストステロンの血中量は変化を示さなかったものの、その分化期前後で比較的高値であった。これらの事実はウナギの性分化過程の生殖腺でみられた間性的性質である両性因子間の拮抗的關係を反映している可能性がある。精巢の微細構造学的観察からライディッヒ細胞と同定される細胞は、精巢分化後の体長 23 cm の精巢の腸間膜に面する側の結合組織中に始めて認められ、その後、体長 32 cm の精巢では、この結合組織中で数を増し集塊をなした。続いて、ライディッヒ細胞は精原細胞の包囊を持つ精小囊の間質域に集塊をなして分布するようになることが明らかとなった。しかしながら、精巢内の体細胞は不活発な形態的特徴を有しており、またステロイド代謝酵素のコレステロール側鎖切断酵素（P-450 scc）の免疫組織化学の結果からも性分化期前後で陽性反応は認められなかった。これらのことから、生殖腺で作られる性ステロイドが本種の性分化に関与している可能性は低いと考えられ、前述の血中ステロイドは生殖腺以外の器官で産生、分泌されていることが推察されたが、これらホルモンの産生器官の同定およびその生理的意義は今後の課題として残された。HCG 投与は体長 32 cm 以上の個体群の精子形成を誘起し、血中 11-KT 量の上昇を引き起こした。微細構造学的特徴からもライディッヒ細胞の活性化が認められた。また、P-450sccの特異抗体を用いた免疫組織化学からも、体長 32 cm 以上の HCG 投与群のライディッヒ細胞で免疫陽性反応が認められた。体長 29 cm から 32 cm の精巢では、ライディッヒ細胞を含む発達した結合組織が腸間膜側から体腔壁側の生殖細胞間の間質域に進入していく過程が観察された。以上のことは、ライディッヒ細胞の間質域への移動がステロイドホルモン産生能を獲得するために、組織構造上必要な変化であることを示唆している。

本種の性決定に関与すると思われる環境諸要因のうち、水温、pH および個体群密度に焦点を当て、それらの生殖腺の分化、発達に及ぼす影響を比較検討した。その結果、pH については生殖腺の性比やその分化過程に組織学的差異は認められず、ウナギの性決定環境因子である可能性は低いものと推察された。また、

水温については性比に変化はみられなかったが、高水温は性分化期の生殖細胞の増殖と分化を抑制し、精巢組織への分化を間接的に促している可能性が示された。密度については、集団飼育群と比較し単独飼育個群において、雌は出現しなかったが、雄の個体数よりも雌雄同体の個体数が増加した。これらの結果は個体群密度がウナギの生殖腺の性分化に関与する可能性が高いことを示しており、今後、環境因子の影響と個体間の社会的相互作用を含めた環境生態学的解析を進める必要性を示唆している。

学位論文審査の要旨

主査	教授	山内	皓平
副査	教授	山崎	文雄
副査	教授	原	彰彦
副査	助教授	上田	宏
副査	助教授	足立	伸次

学位論文題名

河川遡上期におけるニホンウナギの性分化機構に関する研究

魚類の性は基本的には遺伝的支配を受けているが、性分化の過程においてなんらかの外部要因により性の表現型が変化する事実が多数報告されている。これまで、人為的環境下で成長したウナギの性比は、極端に雄へ偏ることが示されている。一方、天然ウナギの個体群では、近年、雌ウナギの出現率が雄のそれより高いことが報告されている。しかし、性比が極端に一方の性へ偏る原因は不明であり、未だに性決定環境因子の実証ならびに性分化機構の解明はなされていない。このような本種の種苗生産用親魚の安定供給を図る上でも養殖ウナギの生殖腺の分化と発達およびそれらの制御に関する基礎的知見が必要である。そこで、本研究では、ニホンウナギの性分化機構を解明することを目的として、養殖環境下で飼育されたウナギの生殖腺の性分化過程を形態学的手法を用いて明らかにするとともに行動生態学および内分泌学的観点からウナギの性分化に及ぼす外部環境因子の影響の実験的解析を行なった。

河川遡上期の体長7cmのシラス期から体長20cmの黄ウナギ期の成長段階における種々の行動観察より、集団で河口域に蟄集したシラスウナギは黄ウナギへの変態が完了する段階で単独行動型に変化し、夜間河川を遡上しながら体長12cmから16cmに達する成長段階までに、生活の根拠となる隠れ穴を確保して独居生活を始めるものと思われた。この時期は性分化が生じる段階と重なることから、ウナギは独居生活を営む河川定着時に生息環境の何らかの影響を受けて性が決定する機構を備えていることが推察された。

飼育環境下のニホンウナギの生殖腺の形態的性分化は体長15-23cmの個体で起こり、その80%以上の個体の生殖腺は精巢に分化し、他の個体は雌雄同体（6～21%）と少数の卵巣（5%以下）に分化した。精巢分化は体長18-23cmの個体でみられ、生殖細胞の緩やかな増加と結合組織の発達に伴う基質体細胞の顕著な増殖発達を特徴とした。一方、卵巣分化は生殖細胞の早期の減数分裂像を特徴とし体長15cm以上の個体でみられた。しかし、飼育群によっては体長15～22cmの未分化個体の約30%が生殖細胞の早期減数分裂像を示しながら、分化した個体群に

は完全な卵巣を有する雌はみられず、少数の雌雄同体と多数の雄の出現が認められた。従って、ニホンウナギの一部は幼時雌雄同体を経た後、雌雄に分化する未分化型雌雄異体種であることが示唆された。

ニホンウナギの性転換には天然のエストロゲンであるエストラジオール-17 β (E2) が有効であり、25~75 mg/kg餌料の比較的広い濃度範囲で 95-100 %の雌化が誘起された。完全かつ機能的な性転換を導くためには、生殖腺の形態的性分化開始(体長15 cm)よりも前の時期から性分化完了時(体長20 cm)、すなわち生殖腺の生理的性分化期と形態的性分化期の双方を通じて処理を施す必要性を示した。さらに、生殖腺の形態学的観察とホルモン処理の結果から、ニホンウナギの性分化開始の臨界期は体長 11 cm (ホルモン処理開始時期) から体長 15 cm (精巣分化の開始) の間に存在することが示唆された。

精巣分化に伴ってステロイドホルモンの血中量は変化を示さなかったものの、その分化期前後で比較的高値であった。精巣の微細構造学的観察からライディッヒ細胞と同定される細胞は、精巣分化後の体長23cmの精巣の腸間膜に面する側の結合組織中に始めて認められ、その後、体長32cmの精巣では、この結合組織中で数を増し集塊をなした。続いて、ライディッヒ細胞は精原細胞の包囊を持つ精小囊の間質域に集塊をなして分布するようになることが明らかとなった。しかし、精巣内の体細胞は不活発な形態的特徴を有しており、またステロイド代謝酵素のコレステロール側鎖切断酵素(P-450scc)の免疫組織化学の結果からも性分化期前後で陽性反応は認められなかった。これらのことから、生殖腺で作られる性ステロイドが本種の性分化に関与している可能性は低いと考えられ、前述の血中ステロイドは生殖腺以外の器官で産生、分泌されていることが推察された。ライディッヒ細胞の活性化は微細構造学的特徴およびP-450sccの特異抗体を用いた免疫組織化学から、HCG を投与した体長 32 cm 以上の個体群で認められた。体長 29cmから32cmの精巣では、ライディッヒ細胞を含む発達した結合組織が腸間膜側から体腔壁側の生殖細胞間の間質域に進入していく過程が観察され、ライディッヒ細胞の間質域への移動がステロイドホルモン産生能を獲得するために、組織構造上必要な変化であることが示唆された。

本種の性決定に関与すると思われる環境諸要因の実験的解析から、水温、pH については生殖腺の性比に差異は認められず、ウナギの性決定環境因子である可能性は低いものと推察された。しかし、密度については、集団飼育群と比較し単独飼育個群において、雌は出現しなかったが、雄の個体数よりも雌雄同体の個体数が増加した。これらの結果は個体群密度がウナギの生殖腺の性分化に関与する可能性が高いことを示しており、今後、環境因子の影響と個体間の社会的相互作用を含めた環境生態学的解析を進める必要性を示唆した。

上述のように、本研究では、養殖環境下で飼育されたニホンウナギの生殖腺の性分化過程を形態学的手法を用いて明らかにするとともに行動生態学および内分泌学的観点からウナギの性分化における外部環境因子の関与を示唆した。これらの結果は、今後、複雑な魚類の性分化機構を解明し、新たな人為的性統御技術

を開発するうえで極めて重要な知見を提供したものとして高く評価され、本論文が博士（水産学）の学位請求論文として相当の業績であると認定した。