

氏 名	おか だ の ぞ み 岡 田 の ぞ み
学 位 の 種 類	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	論 農 博 第 2530 号
学 位 授 与 の 日 付	平 成 16 年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 題 目	Development of tissues involved in eye migration and role of thyroid hormone in metamorphosing Japanese flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>) (変態期ヒラメの眼の移動における周辺組織の発達と甲状腺ホルモンの役割)
論 文 調 査 委 員	(主 査) 教 授 田 中 克 教 授 山 下 洋 助 教 授 田 川 正 朋

論 文 内 容 の 要 旨

ヒラメ (*Paralichthys olivaceus*) は日本周辺のほぼ全域をはじめ、中国大陸や朝鮮半島沿岸域に広く分布し、沿岸漁業や養殖漁業の重要な対象種であるとともに、栽培漁業のモデル魚種として研究や調査が盛んに行われている。本種はまた、眼の移動を伴った体の著しい左右非対称性が発現する特異な変態過程を経ることから、硬骨魚類の変態機構のモデル魚種としても注目されている。本論文は、このヒラメを研究材料として硬骨魚類の変態機構の解明を目指した。第1章では、異体類の眼の移動機構を理解するため、変態期における眼の周辺組織の発達過程を調べた。第2章では、第1章の結果をもとに、眼位異常の奇形個体を組織学的に観察することにより、眼の移動に中心的な役割を担う組織を探索した。また、変態が遅延した異常個体の甲状腺系機能を検討した。第3章では、変態を促進させることが知られている甲状腺ホルモンが、個々の組織の発達にどのように働いているかを、薬理的に体内の甲状腺ホルモンを不足させることなどにより調べた。

第1章 眼の移動における周辺組織の形成過程

変態期のヒラメ仔魚の眼の移動機構を解明することを目的に、硬骨と軟骨の二重染色法及び組織学的手法を用いて、眼の周辺組織の形成過程を観察した。その結果、変態開始前には頭部硬組織の大部分は左右対称的に存在していたが、眼の移動期には副蝶形骨、梁軟骨、眼上管、眼上棒状軟骨などが眼の移動と同じ方向に左右非対称的に形成される様子が観察された。また、眼の移動における最初の左右非対称な組織的变化として、将来の無眼側のみに、眼の下に皮膚に肥厚部が見られた。その後、皮膚の肥厚部分において、偽正中棒状部 (Pseudomesial bar ; Pb) と呼ばれる異体類のみに存在する硬骨が、眼の移動に伴って形成された。また軟組織では、袋状の組織 (Retrorbital vesicle ; Rv) が左右非対称に形成された。PbとRvが左右非対称に形成されることが、ヒラメの眼の移動に重要な役割を果たしていると考えられた。

次に透過型電子顕微鏡を用いて、眼の周辺組織の左右非対称な形成を詳細に調べた。前述したように、眼の移動には軟組織のRvが重要な役割を果たしている可能性が推定されたが、Rvは二次血管系の一部である可能性が高いこと、およびその膜構造から水分の透過性が高く、眼を能動的に押す力は弱いことが予想された。一方もうひとつの候補であるPbは伸長方向と出現位置から、眼の移動において重要であることがより強く示唆された。

第2章 眼の移動に異常のあるヒラメ

異体類の種苗生産では、変態期の眼の移動に失敗する眼位異常が大きな問題となり、飼育方法の改良が試みられている。ヒラメ眼位異常個体の眼の周辺組織を観察すると、頭蓋の一部であるPbに奇形が見られることのみが、全ての眼位異常個体に共通していた。重度異常ではPbが欠損し、同時に頭部の他組織の左右性がランダムとなっていた。これらのことから、Pbは眼の移動において中心的な役割を果たすと考えられ、第1章での考察が支持された。また、Pbの形成には、それに先立つPb周辺の皮膚の肥厚が必須と推測された。

次に、全体の約4%という比較的高い率で出現したヒラメの奇形魚について、変態を調節する甲状腺系を調べた。外部及び内部形態を正常魚と比較して観察した結果、変態における種々の形態変化の停滞がこの奇形の主な症状であった。これら

の個体では甲状腺が形態的に異常であり、チロキシン (T4) の血中濃度も正常魚の1/10以下であった。甲状腺ホルモンに対する各組織の感受性を調べるため、T4 (0.1ppm) と甲状腺ホルモンの合成阻害剤であるチオウレア (TU, 30ppm) を投与した。T4の投与により14日後には仔魚型形質が消失して稚魚型形質が現れた。また、T4投与により甲状腺の活性は正常魚と同様に低下したが、TU投与では正常魚に見られるような活性化像は見られなかった。以上により、この奇形魚では、各組織の甲状腺ホルモン感受性は存在しているが、甲状腺ホルモンの合成能が十分ではなく、ホルモンの不足が変態遅延の原因であったと考えられた。

第3章 変態期の各組織の発達における甲状腺ホルモンの働き

第2章では、甲状腺の異常が奇形の原因となることが示唆された。第3章では、TUの投与により甲状腺ホルモンを不足させた仔魚を実験材料とした。TU投与の結果、これまでの報告と同様に、眼の移動などの形態変化が阻害された。さらに硬骨について詳しく調べてみると、Pbの形成及び他の稚魚型形質に関連のある硬骨の形成が抑制されていた。しかし、他の硬骨の発達については、TUの影響が見られなかった。このことは、甲状腺ホルモン欠乏に対する反応は、硬骨ごとに異なることを示唆している。また、甲状腺ホルモンに対する感受性が存在する時期を調べるため、TUにより甲状腺ホルモンを欠乏させたヒラメに、異なった2回のタイミングでT4を投与した結果、TUを与えてから2週間後にT4を与えた仔魚はほぼ完全な変態を起こし、TUによって抑制されていた骨の発達も促進された。しかし、4週間後にT4を与えた場合には、稚魚型の黒色素胞は発達せず、またPbの形成が進まないために眼の移動も不完全であった。これらのことから、変態期の形態変化に関わる個々の組織の甲状腺ホルモン感受性は、組織ごとに異なった時期に存在することが示唆された。

次に、眼の移動における時期特異的な甲状腺ホルモンの働きを、組織ごとに明らかにするため、変態期の仔魚に異なったタイミングでTUを投与したところ、眼の移動はTUによって阻害された。組織学的に観察した結果、特にPbの形成がTUの影響を強く受けていた。TUをステージD・E (変態始動期) から投与すると、Pbは全く形成されず、右眼は無眼側にとどまっていた。一方、TUをステージF・G (変態初期～中期) から投与した場合には、Pbの形成は正常よりも短かったものの、右眼は有眼側まで移動した。以上の実験結果より、眼の移動において重要な役割を担うPbの形成のためには、ステージEとFの間までに甲状腺ホルモンが存在する必要があることが明らかとなった。

以上のように、本研究では、1) Pbの形成がヒラメの眼の移動に重要な役割を果たしていること、2) 甲状腺ホルモンは時期特異的にPbの形成を促進していること、3) 甲状腺系の異常が眼位異常のひとつの原因となりうること、が示された。魚類のみならず動物全般の変態における形態変化の中でもユニークな、異体類の眼の移動機構の概要が明らかになり、変態期に見られる形態変化において、甲状腺系がある幅を持ちつつも正確に機能することの重要性が示された。

論文審査の結果の要旨

変態を行う生物は動物界に広く知られているが、海産魚類のかなりの部分にも変態現象がみられる。その中で最も典型的な事例は、体の非相称化と眼の移動を伴う異体類 (ヒラメ・カレイ類) の変態である。近年、養殖漁業や栽培漁業の進展に伴い、わが国では10数種の異体類の種苗生産が実施されているが、多くの場合高い頻度で変態に連動した形態異常が発生している。中でも眼の異常 (逆の眼が動く、両方の眼が動く、両方の眼とも動かない) は最も主要なものであり、その防除法の開発が求められている。申請者は、異体類の中で実験材料として最も優れたヒラメ *Paralichthys olivaceus* をモデルに、眼の移動機構を形態学的ならびに内分泌学的に解明することを試みた。得られた主な成果は以下の通りである。

- 1) 硬骨・軟骨二重染色法ならびに組織学的手法を用いて眼の周辺組織の形成過程を観察した結果、変態期には副蝶形骨、梁軟骨、眼上管、眼上棒状軟骨などが眼の移動と同じ方向に左右非対称的に形成されることを明らかにした。
- 2) 眼の移動の最初の左右非対称な組織学的変化として、将来の無眼側のみに、眼の下に皮膚に肥厚がみられ、その後、その部分に異体類に固有な偽正中棒状部 (Pseudomesial bar ; Pb) と呼ばれる硬骨が形成されることを観察した。
- 3) 眼位異常個体の眼の周辺組織の観察により、頭蓋の一部であるPbに奇形がみられることのみが、全ての眼位異常個体に共通することを見出した。また、重度異常ではPbが欠損し、同時に頭部の骨組織の左右性がランダムとなることを明らかにした。
- 4) ある種の奇形魚では甲状腺が形態的に異常を呈し、チロキシンの血中濃度も正常魚の1/10以下であった。また、この奇

形魚でも各組織の甲状腺ホルモン感受性は存在していたが、甲状腺ホルモンの合成能が十分でなく、ホルモンの不足が変態遅延の原因であると推定した。

- 5) チオウレア (TU; 甲状腺阻害剤) を投与して甲状腺ホルモンの合成を抑制すると眼の移動が阻害され、Pb 及び他の稚魚型形質に関連する硬骨の形成が抑制された。また変態期の形態変化に関わる個々の組織の甲状腺ホルモン感受性は組織ごとに異なる時期に存在することを明らかにした。
- 6) TU 投与をいろいろな発育ステージから開始したところ、眼の移動を担う Pb の形成には、変態始動期から変態初期の間までに甲状腺ホルモンが存在する必要があることを明らかにした。

以上のように、本論文はヒラメをモデルにしてこれまで未解明であった異体類の眼の移動機構を詳しく調べ、Pb が極めて重要な役割を担っていること、甲状腺ホルモンが時期特異的に Pb の形成を促進することを明らかにし、異体類の種苗生産技術の改善に寄与するとともに、水産増養殖学ならびに海洋生物学の進展に寄与するところが多い。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成16年2月13日、論文ならびにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。