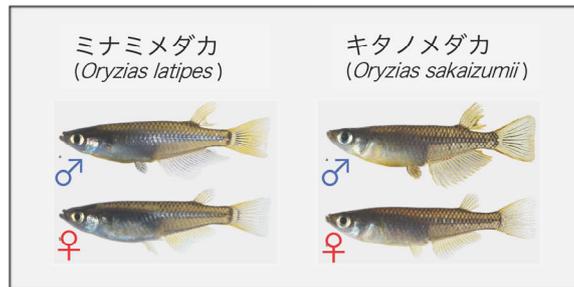


ミナミメダカとキタノメダカ

—どちらのメダカ種が毒性試験に適しているのか？
近縁メダカ2種の種差に関する研究—



神奈川県立 生命の星・地球博物館HPより

長崎大学大学院 水産・環境科学総合研究科
長江 真樹

1

それでは、ただいま御紹介いただきました本発表、「ミナミメダカとキタノメダカ、どちらのメダカ種が毒性試験に適しているのか？ 近縁メダカ2種の種差に関する研究」と題しまして、発表を始めさせていただきます。なお、本研究は近年私が環境省の日英共同研究に参画しておりまして、その枠組みの中で得られた成果を発表させていただきます。

皆様御存じのように、現在日本に生息するメダカは、このミナミメダカ (*Oryzias latipes*) とキタノメダカ (*Oryzias sakaizumii*) の2種に分類されてございますが、この2種に分類されましたことによりまして、様々な主に試験法上の問題点を抱えるに至っております。本日は、この2種の化学物質に対する種差およびそれに関する基礎的研究についてお話しいたします。

メダカの研究上の有用性

- ✓ 小型（省スペース）、飼育が容易、多産。
- ✓ これまで多くの研究で使用され、本種の発生、繁殖生理などについての情報が豊富に蓄積されている。
- ✓ 純系メダカが多く作出されている。
- ✓ 性決定遺伝子（メダカの場合：*dmy*）が同定されている数少ない脊椎動物の一つ（遺伝的性判別が可能）。
- ✓ 外見上で表現的性（機能的性）が判別できる。

（その他にも多くのメリットを備えており）

日本が誇るべき、優良な研究および試験対象生物の一つ。 2

まず、メダカの研究上の有用性について簡単に御説明いたします。これも皆様よく御存じのことと思いますが、メダカの特長である小型であることから、小スペースで飼育が可能。また、これまでも飼育方法が確立されておりますので、飼育が容易かつ多産であることです。また、これまで多くの研究、特に発生学、遺伝学、繁殖生理学の材料として使われてきましたので、メダカについての情報が豊富に蓄積されておりますこと。また、その過程で多くの純系メダカが作出されておりますこと。さらには、数少ない脊椎動物の一つの特徴として、性決定遺伝子、メダカの場合*dmy*ですが、こちらが同定されておりますので、遺伝的性判別が可能である点。また、昨今では小学校の教科書にも記載されておりますが、メダカは外見上で表現的性、機能的性が判別可能であることなど、多くの有用性を有しております。このほかにも多数のメリットを備えており、メダカ種は日本が誇るべき優良な研究および試験対象生物の一つとなっております。

生物の「学名」と「和名」について

学名：生物につける世界共通の名称。
属名＋種小名で表記（二名法）。
例) *Homo sapiens*

和名：日本において学名の代わりに用いられる生物の名称。
「通称」と区別するため、通常カタカナで表記。
例) ヒト

因みに、ヒトと近縁の「ネアンデルタール人」の場合は
学名： *Homo neanderthalensis*
和名： ネアンデルタール人

では、メダカは・・・

3

今回の研究発表では、一般の方にも分かりやすくという観点から、基本的なことについても言及した後、研究の本体に入りたいと考えておりますので、まずは生物の学名と和名について少し触れたいと思います。

学名は、生物につける世界共通の名称でございます。属名プラス種小名の二名法として表記されることが一般的です。例えば我々ヒトの場合、*Homo sapiens*という形で学名がつけられております。

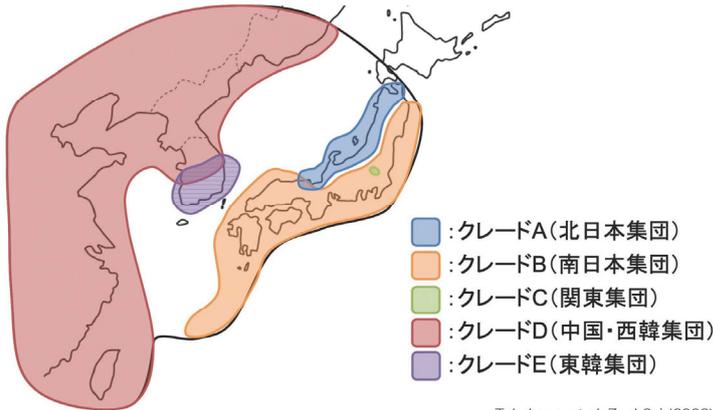
一方和名は、日本において学名の代わりに用いられる生物の名称で、通称名と区別するために通常カタカナで表記されます。我々のヒトの場合は、片仮名でヒトと表記することになっております。ちなみに、ヒトと近縁のネアンデルタール人の場合は、学名が*Homo neanderthalensis*、和名はネアンデルタール人となっております。

メダカの学名と和名：2008年までは・・・

学名：*Oryzias latipes*

和名：メダカ

東アジアに棲息するメダカの分岐群



Takehana *et al.*, Zool Sci (2003)
 Takehana *et al.*, Zool Sci (2004)

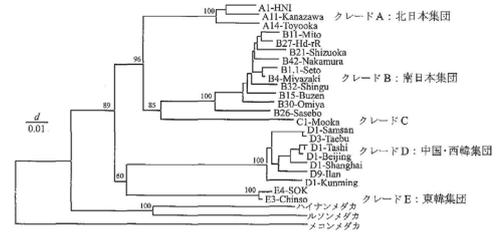


図5 シトクロームb遺伝子(ミトコンドリアDNA)の塩基配列に基づく野生メダカの分子系統樹
 酒泉, 農業および園芸 (2020)

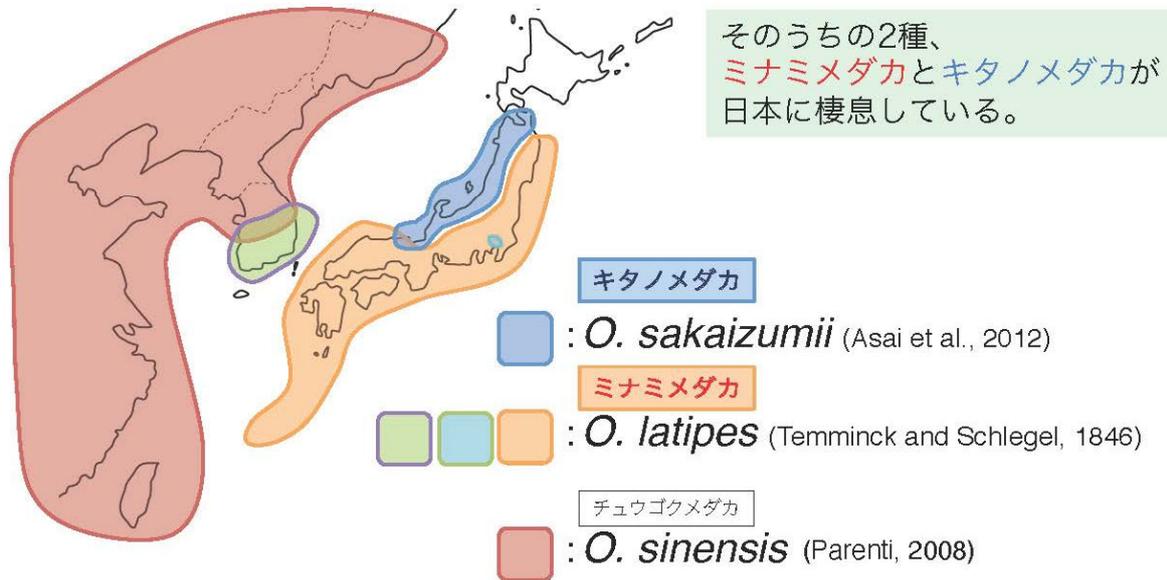
- ✓ 遺伝子配列を用いた解析により、5つのクレード(分岐群)に細分されていた。
- ✓ しかし、分類学上は「1種」であった。

4

ではメダカについてはこういった記載になっているかといいますと、少々複雑ですが、2008年まではこちらに示します*Oryzias latipes*が学名で、和名はメダカと記載されておりました。2008年以前は、この1種として記載されておりましたが、多くの研究によってこの左下に示しておりますような5つのクレード、分岐群に分けられることが明らかになっておりました。クレードAは北日本集団、このブルーの網かけのところです。クレードBが南日本集団、クレードCは栃木県付近に点在しております関東集団と呼ばれるクレードで、この3つが日本に分布していること。さらには中国大陸に、中国・西韓集団としてクレードDおよび東韓集団としてクレードE。この5つに分けられることが、このスライドの右上にありますようなミトコンドリアにありますシトクロームb遺伝子の塩基配列に基づく分子系統樹解析からも明らかになっておりました。

しかし、2008年まではこれらクレードに分けられてはいるものの、1種として記載されておりました。

旧メダカ (旧 *Oryzias latipes*) は 現在 3 種に分類されている



5

そして現在、このメダカは3種に分類されております。ですので、少々混乱しますが、以前のものを旧メダカ、旧*Oryzias latipes*と呼んだ場合に、これが3種に分類されています。3種はそれぞれ、キタノメダカ、*Oryzias sakaizumii*、このブルーの先ほどのクレードAの北日本集団です。2種目が中国メダカ、*Oryzias sinensis*です。先ほどのクレードEの中国・西韓集団です。中国メダカにつきましては、2008年以前までは*Oryzias latipes sinensis*という*Oryzias latipes*の亜種として記載されておりましたが、2008年に突然その亜種のレベルから種のレベル、*Oryzias sinensis*と記載されております。もう一つがミナミメダカ、*Oryzias latipes*で、これがこちらのクレードB、C、Eに当たる種になります。このうち2種のキタノメダカとミナミメダカが日本に生息していることとなります。このため、ここ10年で、このようにメダカを取り巻く分類上の整理が大きく変化したこととなります。

ミナミメダカとキタノメダカの2種に分類されたことで発生している学術的な問題

- ✓ 保有しているのはキタとミナミ、どっち？
- ✓ キタとミナミの判別法は？
- ✓ キタとミナミのハイブリッドも存在するの？
- ✓ これまで得られた研究成果は、キタとミナミ、どちらを使用したもの？
- ✓ 今後、キタとミナミのどちらを使用したら良いの？
→メダカを用いるOECDテストガイドラインでの試験生物に関する問題

6

このように、これまでメダカは1種として研究あるいは試験に使用しておりましたが、現在このミナミメダカとキタノメダカ、少なくとも日本に生息するメダカとして2種に分類されたことで、学術的な問題が以下のとおり発生しております。

まず、根本的な疑問として、ある研究室で保有しているメダカがキタノメダカあるいはミナミメダカのどちらなのか。あるいはその保有しているメダカがキタとミナミのどちらであるのか、こういった判定法によってそれを判断することができるのか。あるいはこの2種のハイブリッドが存在し得るのか。あるいはさらに、これまで得られた研究成果がキタノメダカとミナミメダカ、どちらを使用して得られたものなのか。こういったことが一気に浮上してきたわけです。

さらには、将来的な観点で言いますと、今後試験研究においてキタノメダカとミナミメダカ、どちらを使用することでメリットがあるのかという問題が発生しています。特にメダカを用いるOECDテストガイドラインで、試験生物をどのように扱うかという問題が浮上してきたわけです。

OECDテストガイドラインとは？

OECDテストガイドライン（OECD TG）は、当初、各国が独自に開発していた化学物質の安全性等に関する試験法について、試験結果を各国が共通に使用できるようにすることを目的に、OECDにおいて統一的な試験方法として定められたものである。

メダカを推奨試験魚種として記載している OECD テストガイドライン

TG 203 : Fish, Acute Toxicity Test
TG 204 : Fish, Prolonged Toxicity Test: 14-Day Study
TG 210 : Fish, Early-life Stage Toxicity Test
TG 212 : Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages
TG 215 : Fish, Juvenile Growth Test
TG 229 : Fish Short Term Reproduction Assay
TG 230 : 21-day Fish Assay
TG 234 : Fish Sexual Development Test
TG 240 : Medaka Extended One Generation Reproduction Test (MEOGRT)

但し、それら全てにおける推奨魚種としての記載は「Japanese medaka (*Oryzias latipes*, ミナミメダカ)」のみであり、新たに分類された「*Oryzias sakaizumii*, キタノメダカ」の記載はない。

7

ここで、簡単にOECDテストガイドラインについて触れたいと思います。OECD、経済協力開発機構は、主に経済あるいは貿易の発展に資する目的で設立された国際機関ですが、同時に経済発展とともに化学物質の汚染に対しても対処するために、そういった化学物質の汚染に対する生物評価を統一的に行う試験法として、このOECDテストガイドラインが設定されました。これにより、以前は各国が独自に開発した試験法によって得られたデータを世界で共有するという点において、試験結果を統一的に使用できないという点を改善するために、世界共通の試験法として確立することで、その結果を各国が共通に使用できるということを目的に定められた試験法です。

こちらに記載した10程度の試験法は、全てOECDテストガイドラインでメダカを推奨試験魚種として記載しているものです。例えば1番目のTG203では、魚類の急性毒性試験。さらにTG229では、魚類の短期繁殖試験ですが、これらのいずれにおきましても、推奨試験魚種として記載されておりますのはジャパニーズメダカのみでありまして、新たに分類されました*Oryzias sakaizumii*、キタノメダカに関する記述は現在のところ見当たりません。ですので、これまでメダカを1種として捉えて使用していた時とは異なり、現在このジャパニーズメダカの解釈としてミナミメダカを使用すべきであるのか、あるいはキタノメダカを使用すべきであるのか、あるいはその両方を適用して試験で利用することができるのか、こういった問題が浮上してまいりました。

化学物質の内分泌かく乱作用を調べるための OECD TG にキタノメダカを入れるとしたら・・・

まず、以下のような項目についての基礎データの取得およびミナミメダカとの比較を行う必要あり。

- ✓ 飼育至適温度
- ✓ 産卵数、孵化率、死亡率、成長速度、**二次性徴形質等**に関するデータ
- ✓ **化学物質に対する感受性**
(致死作用、**内分泌かく乱作用**などについて)
- ✓ 各種測定等における交差性
- ✓ 種判別法、(ミナミメダカとの) ハイブリッド判別法

8

仮に化学物質の内分泌かく乱作用を調べるためのOECDテストガイドラインの中に、このキタノメダカをもし入れることになるとしたら、どういったことが必要であるかといえますと、まずここに示したような基礎的データを取得した上で、ミナミメダカとの比較を行い、慎重に議論する必要があります。例えばその試験を行う際の飼育の至適温度を含めた飼育環境、あるいはその種の固有の産卵数、孵化率、死亡率、成長速度など、そういった生存あるいは体成長に関するデータ、さらには成熟段階における二次性徴形質等の発現に関するデータ、こういったものを取得して比較する必要があります。また、内分泌かく乱作用を調べる研究を念頭に置いた場合、そういった化学物質に対する感受性が2種で同等であるのか、あるいは差があるのか。そういったことを、例えば致死作用でありますとか、内分泌かく乱作用に対してデータを取得する必要があります。さらには、例えば抗体を使ったタンパク質の測定等において、その抗体が2種のホモログであるタンパク質に対して同等の交差性を示し、同一の測定系において同感度で測定できるのか。あるいはその試験を行う際に、種判別をきちり行うことができるのか、あるいはハイブリッドを排除するための判別法が確立できるのか。こういったことに関しましてデータを得る必要があります。

そこで、私が参画しております日英共同研究の枠組みでは、この2種の基礎的な比較を行う研究を進めておりまして、本日はこの2種の二次性徴形質等の発現に関する比較および化学物質に対する感受性として、性ホルモンに対するバイオマーカーの応答性を中心にお話しさせていただきます。

ミナミメダカとキタノメダカの比較等に関して これまで行ってきたこと

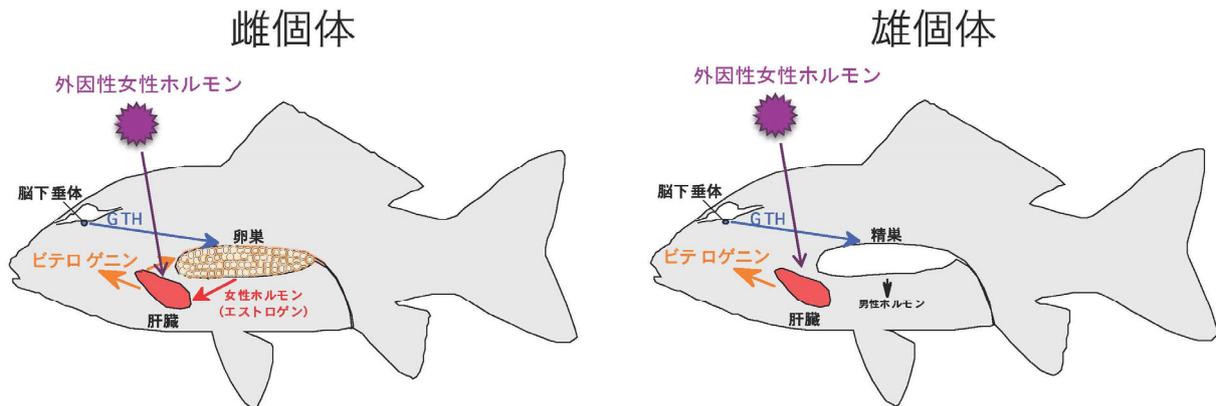
1. 女性ホルモン曝露に対する反応性の比較
2. 男性ホルモン曝露に対する反応性の比較
3. 雄の精巣発達および二次性徴発現の比較

9

その内容として、この3つを予定しております。1つは、両種のメダカに女性ホルモンを曝露した際の反応性の比較。2番目として、男性ホルモンを曝露した際の反応性の比較。3番目として、両種の雄の精巣発達および体成長に伴う二次性徴発現の比較を行いましたので、順に御紹介いたします。

1. 女性ホルモン曝露に対する反応性の比較

卵黄タンパク前駆物質（ビテロゲニン, VTG）をバイオマーカーに用いた雄魚での女性ホルモン反応性検出



雌では、内因性女性ホルモンが豊富に存在するため、外因性女性ホルモンの影響によるビテロゲニン合成が検出できない。

雄では、内因性女性ホルモンが極めて微量であるため、外因性女性ホルモンによるビテロゲニン合成が容易に検出できる。

10

まず1つ目の女性ホルモン曝露に対する反応性の比較ですが、結果に入ります前に、バイオマーカーでありますビテロゲニンに関して少し説明させていただきます。ご存知の方も多と思いますが、卵生の脊椎動物における女性ホルモンに対する優良なバイオマーカーとして、この卵黄たんぱく前駆物質のビテロゲニン、VTGが挙げられます。このスライドでは、絵がコイになっておりますが、左の雌個体では成長と成熟に応じて、ある段階で脳下垂体から生殖腺刺激ホルモンが分泌され、卵巣を刺激し、卵巣から女性ホルモン、エストロゲンが分泌されます。エストロゲンは卵巣内の卵母細胞の成長・発達を促すと同時に、肝臓を刺激して、先ほどの卵黄たんぱく前駆物質、ビテロゲニンの合成を促します。このビテロゲニンは、血流を介して卵巣内の卵母細胞に取り込まれ、栄養成分の一つとして卵内に卵黄成分として蓄積されます。

雄でも同様の内分泌機構により、性成熟が発達しますが、雄個体の場合生殖腺として精巣を保持しておりますため、そこから分泌される性ホルモンは主に男性ホルモンであります。ですので、通常の雄個体では先ほどのビテロゲニンが合成されることはほとんどありませんが、このように外部から女性ホルモン活性を示す外因性の物質が侵入してきた場合、雄個体であっても肝臓でのビテロゲニン合成能は保持しておりますので、この刺激により雄個体でも容易にビテロゲニンが合成されます。雌の場合は、この外因性の女性ホルモンが体内に侵入した場合にもビテロゲニン合成を促しますが、雌では先ほど御説明しました内因性の女性ホルモンの刺激によるビテロゲニン合成であるのか、外因性によるものなのかといった判定が付きませんので、雄個体に女性ホルモンを曝露した際のビテロゲニンをバイオマーカーにすることで、この外因性の女性ホルモン刺激の応答性を検査することができます。ですので、この1番目の女性ホルモン曝露に対する反応性の比較として、メダカのビテロゲニンを指標に試験を行いました。

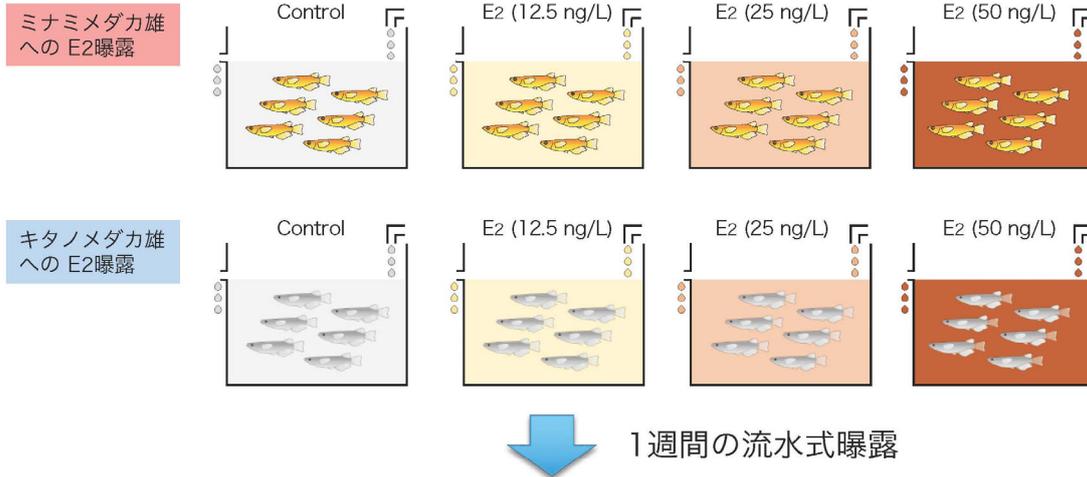
1. 女性ホルモン曝露に対する反応性の比較

曝露物質：17β-エストラジオール (E2)
(脊椎動物が生成する女性ホルモン)

試験環境：水温 25 ± 1°C, 光周期 15L : 9D

試験生物：ミナミメダカ：NIES-R 系統

キタノメダカ：青森県下北郡東通村産



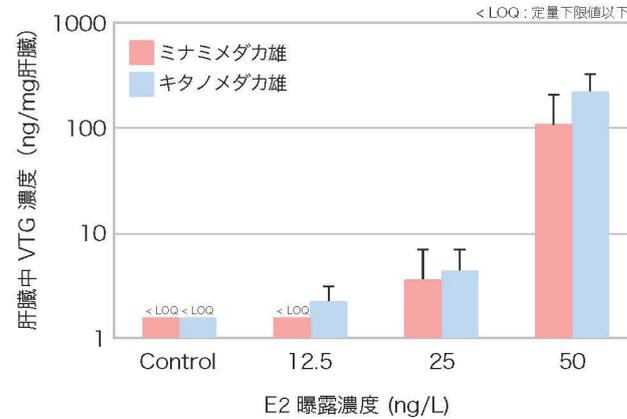
肝臓中 VTG 濃度測定 (ELISA法 (酵素免疫測定法))

11

こちらはその女性ホルモン曝露における試験概要を示しております。曝露物質は脊椎動物が生成する主要な女性ホルモンであります17β-エストラジオール (E2) を曝露しました。試験環境は記載のとおりでありまして、試験生物はミナミメダカとしてNIES-R系統、キタノメダカとして青森県下北郡東通村産の個体を用いました。

これらの雄個体にそれぞれ表記の濃度でE2曝露を流水式として行いました。1週間の流水式曝露の後に、それぞれの雄個体から肝臓を採取し、肝臓中のビテロゲニン濃度をELISA法、酵素免疫測定法で測定し、比較しました。

1. 女性ホルモン曝露に対する反応性の比較



2種メダカ間での外因性女性ホルモンへの反応性に有意な違いは認められなかった。

12

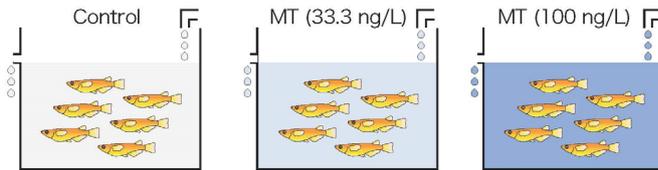
こちらがその結果になります。横軸が曝露したE2の濃度、縦軸が測定しました肝臓中のビテロゲン濃度を対数軸として示しております。赤がミナミメダカ雄のビテロゲン濃度で、青がキタノメダカ雄のビテロゲン濃度です。このように曝露したE2濃度依存的に、肝臓でのビテロゲン合成量が増加し、このように濃度上昇が認められますが、いずれの濃度区においてもキタノメダカとミナミメダカの肝臓中のビテロゲン濃度に有意な差は認められませんでした。同様の試験を複数回繰り返しましたが、いずれの試験回におきましても、同様の結果が得られており、女性ホルモン応答性という観点ではこの2種のメダカに有意な差は認められないという結果になりました。

2. 男性ホルモン曝露に対する反応性の比較

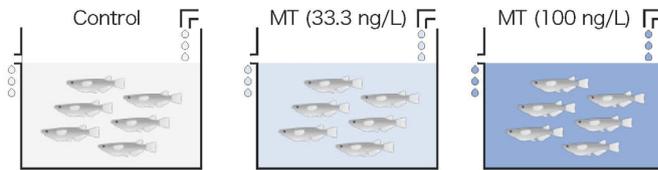
曝露物質：17 α -メチルテストステロン (MT)
(合成男性ホルモン)

試験環境：水温 25 \pm 1 $^{\circ}$ C, 光周期 15L : 9D
試験生物：ミナメダカ：NIES-R 系統
キタノメダカ：青森県下北郡東通村産

ミナメダカ雌への MT 曝露



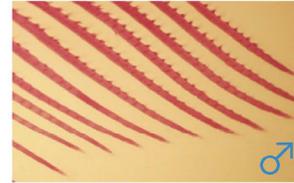
キタノメダカ雄への MT 曝露



1および2週間の流水式曝露

臀鰭軟条上の乳頭状小突起 (PPs) 数をカウント

メダカ臀鰭軟条の二次性徴形質

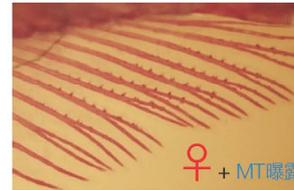


成熟雄では、内因性男性ホルモンの作用により、乳頭状小突起 (Papillary processes (PPs)) が形成される。



成熟雌では、軟条先端の「分岐」化が起こる。

↓ 雌への MT 曝露



雌に外因性男性ホルモンを曝露すると、このように PPs が形成される。

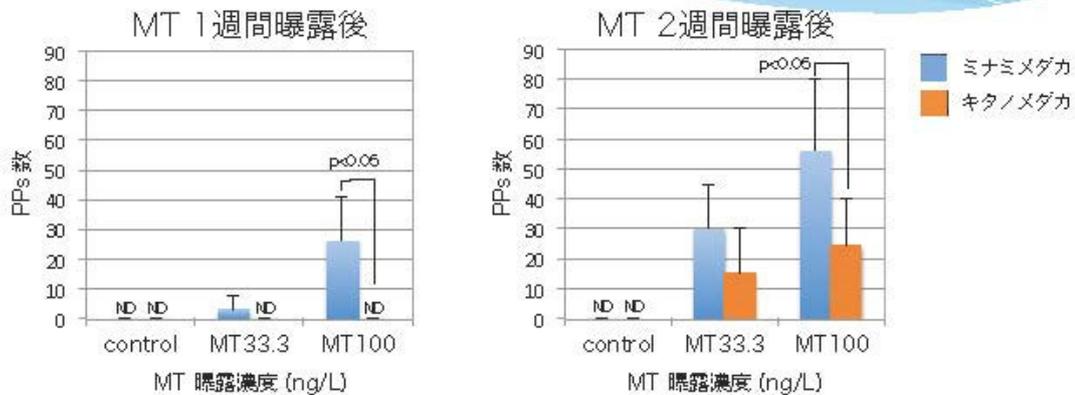
↓ 男性ホルモン反応性の指標。

13

続きまして、男性ホルモン曝露に対する反応性の2種の比較を行いました。こちらは先ほどとは逆に、それぞれの雌個体に男性ホルモンであります、合成男性ホルモン17 α -メチルテストステロン (MT) を曝露いたしました。試験環境、試験生物は先ほどと同様です。この男性ホルモン曝露におけるバイオマーカーとして、メダカの尻鰭に形成される雄の二次性徴形質である乳頭状小突起、Papillary processes (PP) を指標としました。

こちらの右側の写真は、上段が成熟した雄個体の尻鰭、下が雌個体の尻鰭の軟条の様子です。成熟した雄個体では、このように小さなドットが御覧いただけるかと思うのですが、乳頭状小突起が形成されます。一方成熟した雌には、そういった乳頭状小突起の形成は一切なく、尻鰭軟条の先端がこのようにY字状に分岐する分岐化が起こるのみとなっております。このような成熟雌で、もともと乳頭状小突起を形成してない成熟した雌であっても、その雌に男性ホルモンであるMTを曝露しますと、このように先端は分岐した雌の形状を保持したまま、軟条のこのフラグメントの1つ1つに乳頭状小突起が形成されるとい、この雄の二次性徴が雌に男性ホルモン曝露することにより形成誘導されますので、今回のこの男性ホルモン曝露におけますバイオマーカーとして、雌の尻鰭に新たに形成されるこの乳頭状小突起数を指標としてカウントし、両種の比較を行いました。曝露濃度は、ここの2濃度区でございまして、1週間および2週間の流水式曝露を行った後、尻鰭を固定染色し、乳頭状小突起数をカウントしました。

2. 男性ホルモン曝露に対する反応性の比較



- ✓ MT曝露1週間後では、ミナミではPPs形成が曝露濃度依存的に確認されるが、キタではその形成は全く認められない。
- ✓ MT曝露2週間後には、キタにおいてもPPs形成が検出されるが、ミナミとの間に有意差が認められる。

→2種間の男性ホルモン反応性に差があることが示唆された。

14

こちらが結果になります。左が男性ホルモンでありますMTを1週間曝露した結果、右側が2週間曝露です。横軸が曝露濃度、縦軸は尻鰭上に形成された乳頭状小突起数を示しております。1週間後におきましては、青で示しましたミナミメダカにおきましては、曝露したMT、男性ホルモンの濃度依存的な乳頭状小突起数の増加が認められましたが、曝露後1週間ではキタノメダカではまだ乳頭状小突起の形成は認められませんでした。2週間後になりますと、ミナミメダカではそれぞれ乳頭状小突起数の増加が認められ、キタノメダカにおきましては2週間後に初めて乳頭状小突起が形成されました。

しかし、この乳頭状小突起形成の開始のタイミングがキタノメダカでは遅いこともありまして、2週間後の高濃度曝露群ではこのように乳頭状小突起数において両種の間で有意な差が認められました。こちらの試験におきましては、複数回同様の試験を繰り返し反復して行いましたが、いずれの曝露試験回におきましては、このように両種で乳頭状小突起の数が異なりました。ミナミメダカのほうがキタノメダカよりも乳頭状小突起の形成という観点での男性ホルモンに対する反応性は高いという結果が得られました。ですので、女性ホルモンと男性ホルモンに対して、この2種に関して反応性の違いが認められるのではないか、そういう結論に至りました。

ここまでの研究成果から・・・

- I. 男性ホルモンに対する反応性において、キタノメダカはミナミメダカに劣ることが示唆された。
- II. この結果を受けて、両種の通常の雄においても、二次性徴形質であるPPsの形成に種間性がある可能性が予想された。
- III. 加えて、PPs形成と密接に関連する精巣の発達状況（PPs形成を誘導する内因性男性ホルモン分泌）との関連についても調査する必要性が浮上した。

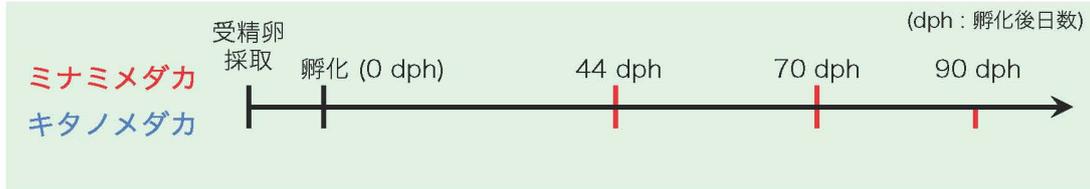
即ち、上記 II. および III. のような、両種の体成長に伴う性成熟や二次性徴などに関する「基礎的知見」の集積に立ち返る必要があるため、次に「3. 雄の精巣発達および二次性徴発現の比較」を行った。

15

ここまでの結果を受けまして、いま御説明しましたように、女性ホルモンに対する応答性に関しては、今回使用した2種のメダカに関しては差は認められませんでした。男性ホルモンに対する応答性に関しては、キタノメダカはミナミメダカに劣ることが示唆されました。この結果を受けまして、乳頭状小突起形成と密接に関連する精巣の発達状態も含めて、両種のこの乳頭状小突起の形成と体成長、あるいはそれに関連する精巣の発達に関して、基礎的なデータを蓄積する必要があると考え、今度は性ホルモン曝露試験ではなく、両種の個体を通常に飼育した際のこのようなデータの蓄積を試みました。ゆえに、3番目の観点として、両種雄の精巣発達および二次性徴発現の比較を行いました。

3. 雄の精巣発達および二次性徴発現の比較

個体の飼育・サンプリングスケジュール



- ✓ 同一日に2種メダカの受精卵を採取。
- ✓ 同一の飼育条件で飼育（水温 25 ± 1 °C、光周期 15L : 9D）。
- ✓ 孵化後44、70および90日後にサンプリング。
 - ・全長および体重測定
 - ・臀鰭上の PPs 数カウント
 - ・精巣発達の組織学的観察
- ✓ 遺伝的雄であることの確認（PCRによる *dmy* 遺伝子の増幅）

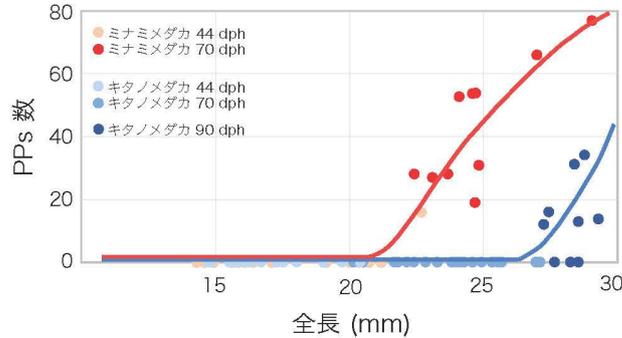
16

こちらがその試験における個体の飼育とサンプリングスケジュールです。使用したミナミメダカ、キタノメダカは、先ほどと同様で、同時期に受精卵を採取し、孵化した個体を同一環境で飼育し、孵化後44日、70日およびキタノメダカにおきましては90日後に個体を採取し、サンプリングいたしました。

その際、全長および体重を測定するとともに、先ほどと同様の方法で尻鰭上の乳頭状小突起数をカウントするとともに、同個体の精巣発達を組織学的に観察しました。同時に、遺伝的雄であることの確認も *dmy* の PCR によって行いました。

3. 雄の精巣発達および二次性徴発現の比較

2種メダカの体成長に伴う臀鰭 PPs 数の変化



- ✓ 2種ともに、全長約22mmまでは PPs 形成が認められない。
- ✓ ミナミメダカでは、全長約22mm以降、体成長依存的に PPs 形成数が増加した。
- ✓ 一方キタノメダカでは、70dph (最大全長約27mm) までは明瞭な PPs 形成が全く認められず、90dph (>全長約27mm) 以降に初めて PPs 形成が認められた。

2種メダカ間で精巣発達 (内因性男性ホルモン分泌) が異なる？
→精巣発達の組織学的解析

17

こちらが結果になりますが、横軸が全長、縦軸が尻鰭に形成された乳頭状小突起数になります。まずこの赤色、暖色系で示しました点が、ミナミメダカの孵化後44日目および70日目の結果ですが、孵化後44日目では全長が平均で約18mmですが、ほとんどの雄個体で乳頭状小突起の形成はまだ認められておりませんが、最も成長促進した全長約23mmの個体では、このように20個弱ですが、尻鰭に既に乳頭状小突起の形成が認められております。孵化後70日になりますと、調査した全ての雄個体でこのように乳頭状小突起の形成が体成長依存的に認められました。

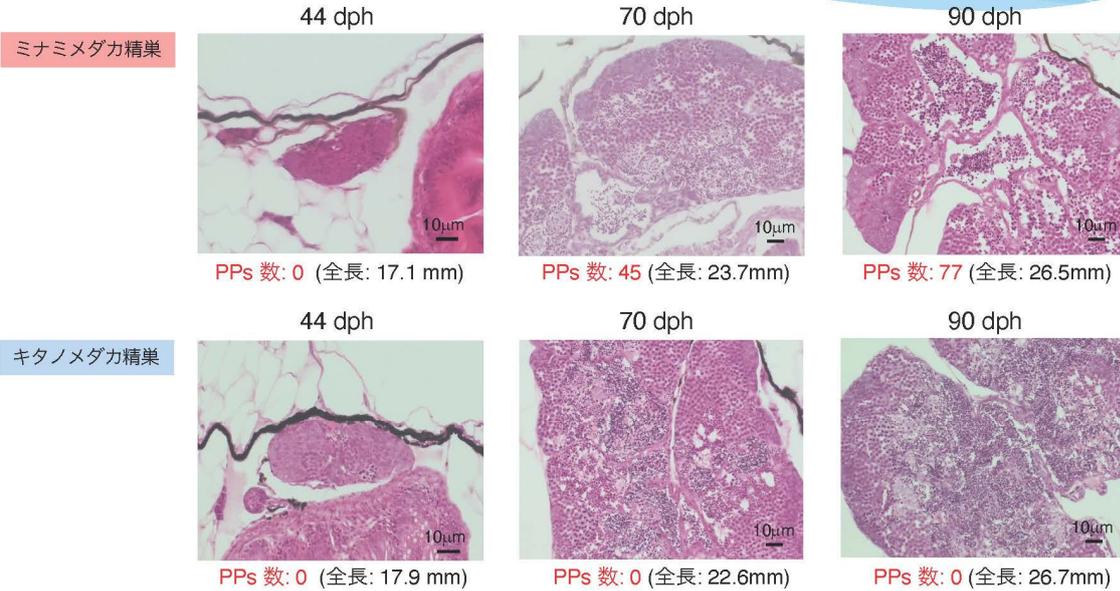
一方キタノメダカはこちらの青色、寒色系で示しておりますが、先ほどのミナミメダカとは異なり、孵化後70日、最大全長で26~27mmまでは一切乳頭状小突起の形成が認められませんでした。キタノメダカにおきましてはこのような結果を得ましたので、90日後にもサンプリングし、同様の解析をしたところ、孵化後90日後に初めてこのように乳頭状小突起の形成が認められましたが、全長27mmを超える雄個体であっても、まだその形成が認められない個体も一部存在するという結果を得ました。

すなわちこのように、ミナミメダカとキタノメダカでほぼ同一の体成長、全長でありながら、尻鰭の二次性徴形質であります乳頭状小突起の形成過程に大きな違いがあるということが分かりました。こちらの試験に関しても、複数回同様の飼育・解析を行って、毎回ほぼ同様の結果が得られており、この使用した2種に関しては、ほぼ固定した結果であると考えています。

すなわち、このように、二次性徴であります乳頭状小突起の形成に大きな違いがありますことから、その乳頭状小突起の形成を誘導する体内の男性ホルモンの分泌レベルが、成長に伴ってこの2種間で異なるのではないかとということが最も直接的な推論として浮かびましたので、これら個体の精巣発達を組織学的に解析しました。

3. 雄の精巣発達および二次性徴発現の比較

2種メダカの体成長に伴う精巣発達



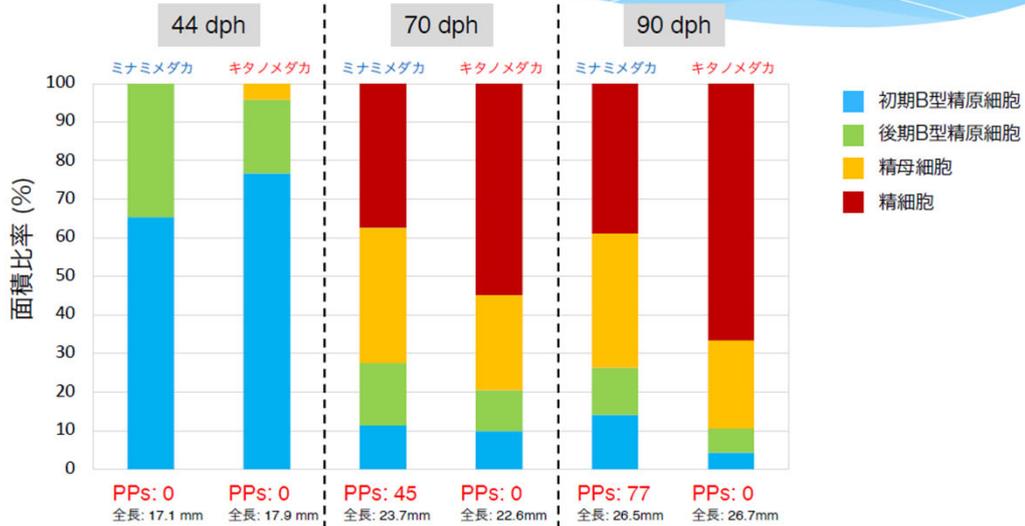
PPs 形成数に関わらず、体成長に伴う精巣発達には2種間で大きな違いは認められない。

18

このスライドは、上段がミナミメダカの精巣、下段がキタノメダカの精巣をそれぞれ示しております。左から、孵化後44、70、90日の個体のもので、赤色で示しておりますのはその個体の尻鰭に形成された乳頭状小突起の数を、括弧内に全長を示しております。特に全長におきましては、両種でほぼ同一のものを選択して組織解析を行っております。このように精巣の組織学的解析という観点では、この孵化後日数に伴ってキタノメダカとミナミメダカで大きな差はないと判断されました。すなわち、先ほどお示しましたように、乳頭状小突起の形成には両種でそのタイミングや数に大きな違いが認められましたが、その形成の直接的な要因として分泌される男性ホルモン、その分泌を担う精巣発達には、2種間で大きな違いが認められないことが示唆されました。

3. 雄の精巣発達および二次性徴発現の比較

2種メダカの子孫中の生殖細胞発達状況



精巣の生殖細胞発達ステージの進行・比率から見ても、2種メダカ間に大きな差はない。

→2種間の男性ホルモン反応性や体成長・精巣発達に伴う PPs 形成の差は、他の要因 (例えば、腎臓での男性ホルモン受容体 (AR) の発現量など) に依る可能性が推察された。

19

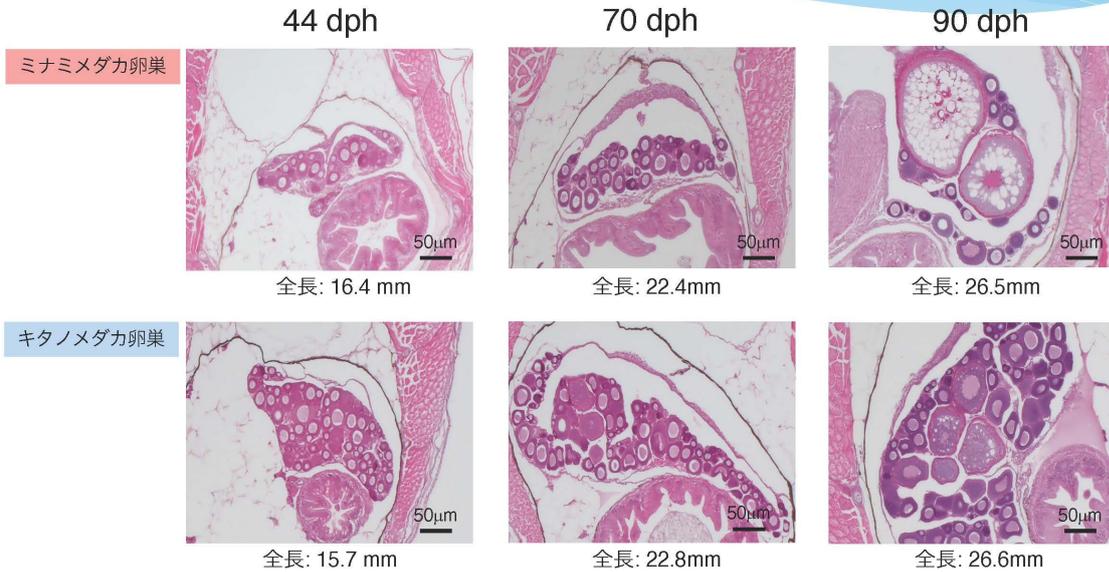
このグラフは、いま御覧いただいた組織切片上の生殖細胞をそれぞれステージ別に分類し、その面積比率で示したものです。左から孵化後44、70、90日後の個体で、左がミナミメダカ、右がキタノメダカになります。このように解析した個体においては、キタノメダカで若干精子形成に向けた生殖細胞の分化ステージが先行するような傾向も認められますが、まだ個体数が少ないため、現時点では精巣発達と同様に、生殖細胞の分化ステージという点におきましても2種間でほぼ孵化後日数あるいは体成長に伴って大きな差はないということが明らかになりました。

これらの結果を統合しますと、こういった体成長あるいは精巣発達に関しては、2種間で同一の環境下で飼育した個体においては、ほぼ同等でありながら、乳頭状小突起の形成過程については大きな違いがあるという結果を、現在のところ得ております。そのため、これら精巣から分泌される男性ホルモン量にはそこまで大きな違いはないと考えられるため、乳頭状小突起の形成数の大きな差といえますのは、その分泌された男性ホルモンの尻鰭の受容体での受容、その後の乳頭状小突起形成に関わるタンパク合成、そういった男性ホルモン受容、作用発現に至る過程で2種間で差がある可能性があるかと、現段階では考えております。

この部分に関する解析はまだ進んでおりませんが、こういったところに2種間の男性ホルモン応答性に対する反応性差が関与しているのではないかと、現段階では考えております。

3. 雄の精巣発達および二次性徴発現の比較

2種メダカの体成長に伴う卵巢発達



雌の卵巢発達においては、ミナミメダカでその進行がやや早い可能性もある（解析サンプル数を増やす必要あり）。

20

これは補足になりますが、この飼育過程で同時に雌個体も得られておりますので、雌の卵巢の組織学的解析も同様に行いました。この写真の見方は、先の精巣のスライドと同様で、上段がミナミメダカ、下段がキタノメダカのそれになります。このように卵母細胞の発達が認められ、個体数が少ないのでまだ明言できる段階ではないですが、ミナミメダカのほうが卵母細胞の成長、進行という意味では若干早いのかなという印象を受けておりますが、そこまで大きな差はないものと考えております。

まとめ

- ❖ 2種メダカの性ホルモン反応性において、女性ホルモン反応性では殆ど差は見られなかったが、男性ホルモン反応性においては、キタノメダカはミナミメダカに劣ることが示唆された。
- ❖ 2種メダカ雄の体成長に伴う尻鰭上 PPs 形成の進行においても、キタノメダカはミナミメダカよりも遅いことが示された。
- ❖ しかし、2種メダカの精巣発達（生殖細胞の分化・発達）には殆ど差が認められなかった。
- ❖ 2種間の男性ホルモン反応性や体成長・精巣発達に伴う PPs 形成の差は、他の要因（例えば、尻鰭での男性ホルモン受容体 (AR) の発現量など）に依る可能性が推察された。

以上、本研究の結果をまとめさせていただきます。

最初に示しましたように、2種メダカの性ホルモン応答性に関しましては、女性ホルモン反応性ではほとんど両種間に差は認められませんでした。男性ホルモン反応性においては、キタノメダカはミナミメダカに劣ることが示唆されました。もちろんこれは尻鰭上の乳頭状小突起の形成という観点、その一部分から判断したのですが、複数の試験回においてほぼ再現性の高い結果が得られておりますので、今回使用した2種に関しては明瞭な差があると考えております。

次に行った2種メダカの雄の体成長に伴う尻鰭上の乳頭状小突起形成の進行においても、キタノメダカはミナミメダカよりも遅いことが示されました。しかし、先ほど組織写真を御覧いただきましたが、この2種のメダカの精巣発達に関しては、大きな違いは認められないということになりました。ですので、最初の男性ホルモン曝露で認められたキタノメダカで乳頭状小突起形成が遅い、あるいは通常に飼育した雄個体の場合でもキタノメダカの乳頭状小突起形成がミナミメダカより遅いというこの2点が、今のところ精巣で生産された内因性の男性ホルモンを尻鰭で受容し、二次性徴形質である乳頭状小突起形成に繋がる過程のどこかに、律速段階等が発生し、2種間のこのような乳頭状小突起の形成数の差につながっているという点で、2種で違いがあるものと、現段階では推定しております。

静岡県立大学の小林先生らは、今回私が使用した2系統以外に多くの両種の系統を用いて、性ホルモン曝露による性転換の実験を行っておられまして、その結果からも、2種に性ホルモン応答性に差がある、またその差はキタノメダカとミナミメダカの2種間のみならず、ミナミメダカ、キタノメダカの種内においても異なる系統で違いがあるということから、メダカの2種間だけではなく、同種の系統間におきましても、こういった差異が認められますことから、ここまでの研究で分かりましたことは、実際に試験に使用するメダカがどういう個体でどのような特徴を持つのかということ踏まえた上で試験に使用する必要がある、そういうふうと考えております。

長くなりましたが、以上で私の発表を終了いたします。御清聴ありがとうございました。