

The United Graduate School of Agricultural Sciences,  
Tottori University

カライワシ上目ウナギ目アセウツボとマアナゴの消化管に  
おける光学及び走査型電子顕微鏡による比較組織学的研究

(Comparative histological study of the digestive tracts in  
*Gymnothorax pictus* and *Conger myriaster* (Elopomorpha;  
Anguilliformes) by light and scanning electron microscopy)

滝上 俊平

著

As Partial Fulfillment of the Requirement  
for the Award of the Degree of Doctor of Philosophy

At

Department of Bioresources Science  
The United Graduate School of Agricultural Sciences,  
Tottori University

February 2015

カライワシ上目ウナギ目アセウツボとマアナゴの消化管に  
おける光学及び走査型電子顕微鏡による比較組織学的研究  
(Comparative histological study of the digestive tracts in  
*Gymnothorax pictus* and *Conger myriaster* (Elopomorpha;  
Anguilliformes) by light and scanning electron microscopy)

滝上 俊平

2015

# 目次

第1章 緒言	1
第2章 ウツボ亜目ウツボ科アセウツボの消化管における組織学・ 組織化学的研究	
2-1 序論	9
2-2 材料と方法	11
2-3 結果	13
2-4 考察	26
第3章 アナゴ亜目アナゴ科マアナゴの消化管における組織学・ 組織化学的研究	
3-1 序論	29
3-2 材料と方法	31
3-3 結果	33
3-4 考察	48
第4章 総括	52
参考文献	56
謝辞	63

# 第1章

## 緒言

食物を摂取し栄養を吸収する体の働きは、動物にとって必須の要件であり、全ての動物が行なう重要な生命活動の一つである。生物は進化の過程で様々な機能を獲得するとともに生息域は拡大し多様化していったと考えられる。食性も肉食性、草（海藻）食性、雑食（肉食と草食）性及びデトリタス食性等、地球のあらゆる有機体を生物は補食しているが、多くの動物の食性は特性化しており、魚類は生息域（表層、中層及び低層）に共棲するプランクトンやネクトン、ベントスを捕食することで、ニッチをお互いが提供し多様性を維持していると考えられる。このように動物種によって食性が特性化していることから、摂取した食物を消化・吸収するシステムもまた多様化していると推察される。

消化器系臓器は消化吸收の場となる消化管と、消化液を分泌する付属腺である肝臓及び膵臓から構成されている。消化管は両生綱以降の陸生脊椎動物においては口腔、咽頭、食道、胃、十二指腸、小腸及び大腸を形成している。一方、下位真骨類を除く多くの硬骨魚類の消化管には陸生脊椎動物には見られない幽門垂が認められる（ローマーとパーソンズ, 2007) (Figure 1a)。幽門垂は一般的に胃に付属する器官であり、コイ目やスズキ目ベラ科などの無胃魚には認められないが、ナマズ目やスズキ目ハゼ科などには胃を有するが幽門垂を欠く種が知られている（秋吉ら, 2003）。硬骨魚類における三種類の消化管形態（有胃・有幽門垂、有胃・無幽門垂及び無胃・無幽門垂）を Figure 1b に模式的に示す。このように硬骨魚類には、消化器系臓器の形態と系統発生的な相関が存在することが知られている。

硬骨魚類は系統発生的には肉鰭綱と条鰭綱に大別され、肉鰭綱は肺魚亜綱及びシーラカンス亜綱、条鰭綱は分岐鰭亜綱、軟質亜綱と新鰭亜綱にそれぞれ区分される。新鰭亜綱は真骨類を有し、アロワナ上目、カライワシ上目、ニシン上目、骨鰾上目及び原棘鰭上目

までの下位真骨類と、これらの後に分岐した棘鱗上目群で構成される (Nelson, 1994).

下位真骨類における消化管は、アロワナ上目では有胃・有幽門垂 (Al-Mahrouki and Youson, 1998), カライワシ上目では有胃・無幽門垂, ニシン上目 (Hossain and Dutta, 1996) では有胃・有幽門垂, 骨鰈上目では有胃・無幽門垂及び無胃・無幽門垂, 原棘鱗上目では有胃・有幽門垂がそれぞれ認められる. このように下位真骨類の消化管は系統発生的な分岐に伴って多様化している (Figure 2). 硬骨魚類消化管の各器官における解剖学的ならびに組織学的特徴は以下の通りである.

食道粘膜は重層扁平上皮と多数の杯細胞で構成され, 上皮細胞頂部には指紋状の微小隆起が観察される. 筋層には横紋筋層が含まれる. 胃は直線状, J字状及びY字状と様々な形態を示し (Suyehiro, 1942), 組織学的には噴門部, 体部及び幽門部に区分される. Y字状の胃は噴門部と幽門部が並列し体部が盲嚢を形成することから, 特に盲嚢胃と呼ばれる. 粘膜は噴門部, 体部及び幽門部いずれにおいても単層円柱状の胃表層粘膜上皮細胞から構成され, 上皮細胞は中性粘液を産生する. 筋層は内輪走性と外縦走性の二層である. 噴門部の筋層には食道から横紋筋層が連続する. 胃体部は胃底部とも呼ばれ胃小窩が内腔に開口しており, 粘膜固有層は管状の胃腺で占められている. 走査型電子顕微鏡 (SEM) 像では微絨毛が上皮細胞間に分布し, 筋層は内輪走層が発達している. 幽門部は胃腺を欠いており, 筋層は三部の中で最も発達しており幽門括約筋とも呼ばれる.

幽門垂は胃と腸の間に付属する盲嚢器官であり, 粘膜は単層円柱上皮と杯細胞から構成され腸と類似した組織構造を有する. 幽門垂は消化酵素の分泌を行ない, 吸収面積を増加させる機能が報告されており (Buddington and Diamond, 1986), 系統発生的な多様性が認められる (秋吉ら, 2003).

腸螺旋弁は軟骨魚綱 (Chatchavalvanich et al., 2006), 肺魚亜綱 (Icardo et al., 2010) 及び分岐鱗亜綱 (Abdel, 1975) などにおける太く短い腸の内壁に見られる特殊な構造であり, 螺旋状の粘膜ひだが複数の憩室を形成することが特徴である.

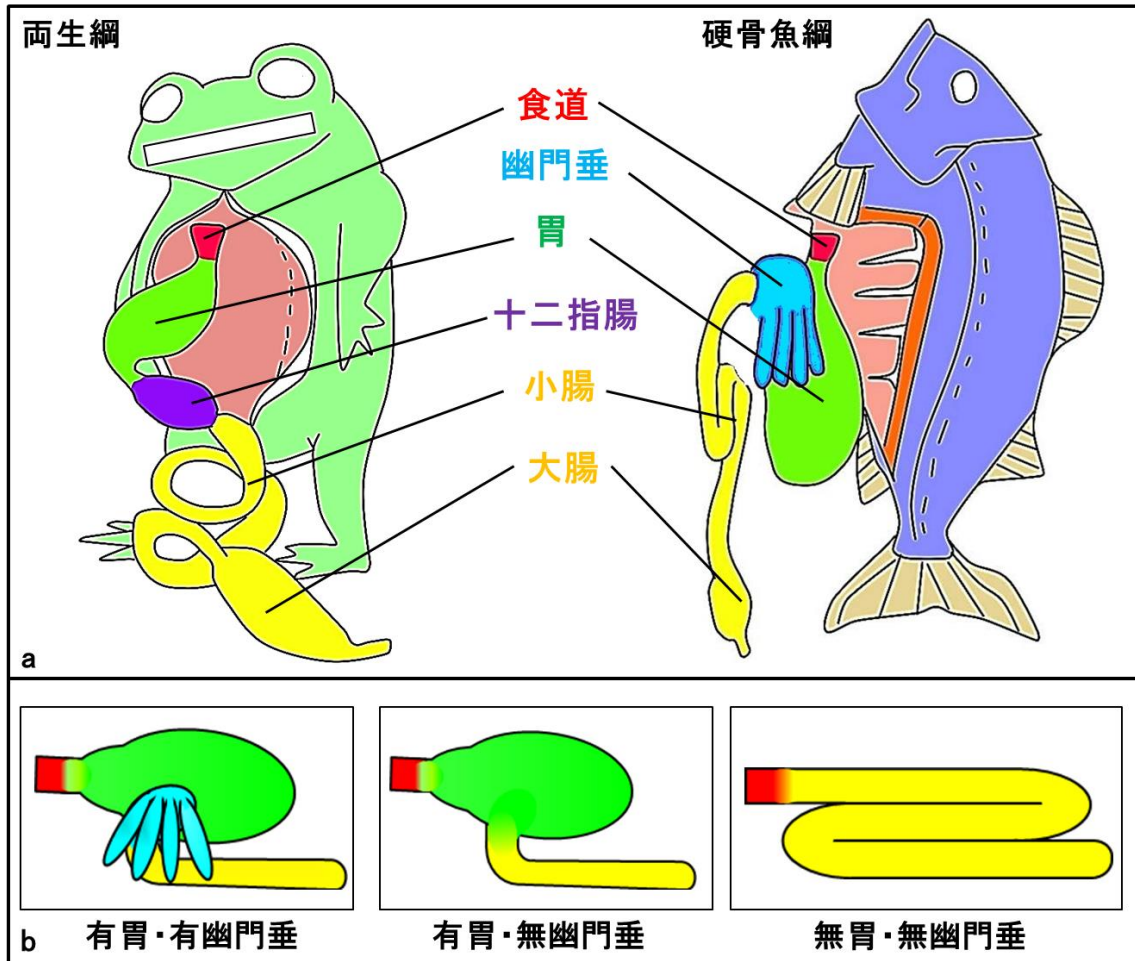
小腸粘膜は単層円柱上皮と杯細胞から構成されており，杯細胞は酸性及びまたは中性粘液を含む．細胞頂部には密な微絨毛が分布し，筋層は内輪走性と外縦走性の二層で構成される．大腸は真骨類では未発達で，直腸とは弁で仕切られている．直腸の筋層は小腸の筋層よりも発達している．

このように下位真骨類の消化器系臓器には系統発生的な多様性が存在しているが，下位真骨類であるアロワナ上目とカライワシ上目の系統関係については諸説がある (Figure 3). Patterson と Rosen (1977) は中生代の化石を中心とした神経頭蓋と尾骨の比較解剖学的観察により，アロワナ上目が最初に分岐したとする系統仮説を提唱した．一方，化石種と現生種の尾骨と尾椎を比較した Arratia (1997) は，カライワシ上目が最初に分岐したとする系統仮説を主張している．分子データに基づく研究では，28S リボソーム RNA の塩基配列を比較し，カライワシ上目とアロワナ上目は姉妹群であるという系統仮説 (Lê et al., 1993) が提唱されている．近年，ミトコンドリアゲノムを用いてアロワナ上目が最初に分岐したとする系統仮説が発表された (Inoue et al., 2001a). これは Patterson と Rosen の系統仮説を支持し，またアロワナ上目とカライワシ上目以外の上目の位置関係についてこれまでの系統仮説を総括するものであったため，現在主流となっている．下位真骨類において，特にアロワナ上目とカライワシ上目の消化器系臓器に関して，系統発生的観点からの解剖及び組織構築に関する知見は少ない．

カライワシ上目ウナギ目の消化器系臓器に共通する特徴は，大型の盲嚢胃を有する一方で幽門垂を欠いていることである．カライワシ上目の消化管における研究は，ウナギ目ウナギ科ヨーロッパウナギ *Anguilla anguilla* 及びニホンウナギ *Anguilla japonica* で報告されている．食道は長く，粘膜は重層扁平上皮と杯細胞から成り，指紋状の微小隆起構造を上皮細胞頂部に有する (Abaurrea-Equisoain and Ostos-Garrido, 1996). 杯細胞は酸性及び中性粘液を含み，筋層は横紋筋で構成される (Yamamoto and Hirano, 1978; Domeneghini et al., 2005). 胃は長い盲嚢を有する Y 字状で，噴門部，底部及び幽門部に大別される (Ostos-Garrido et al.,

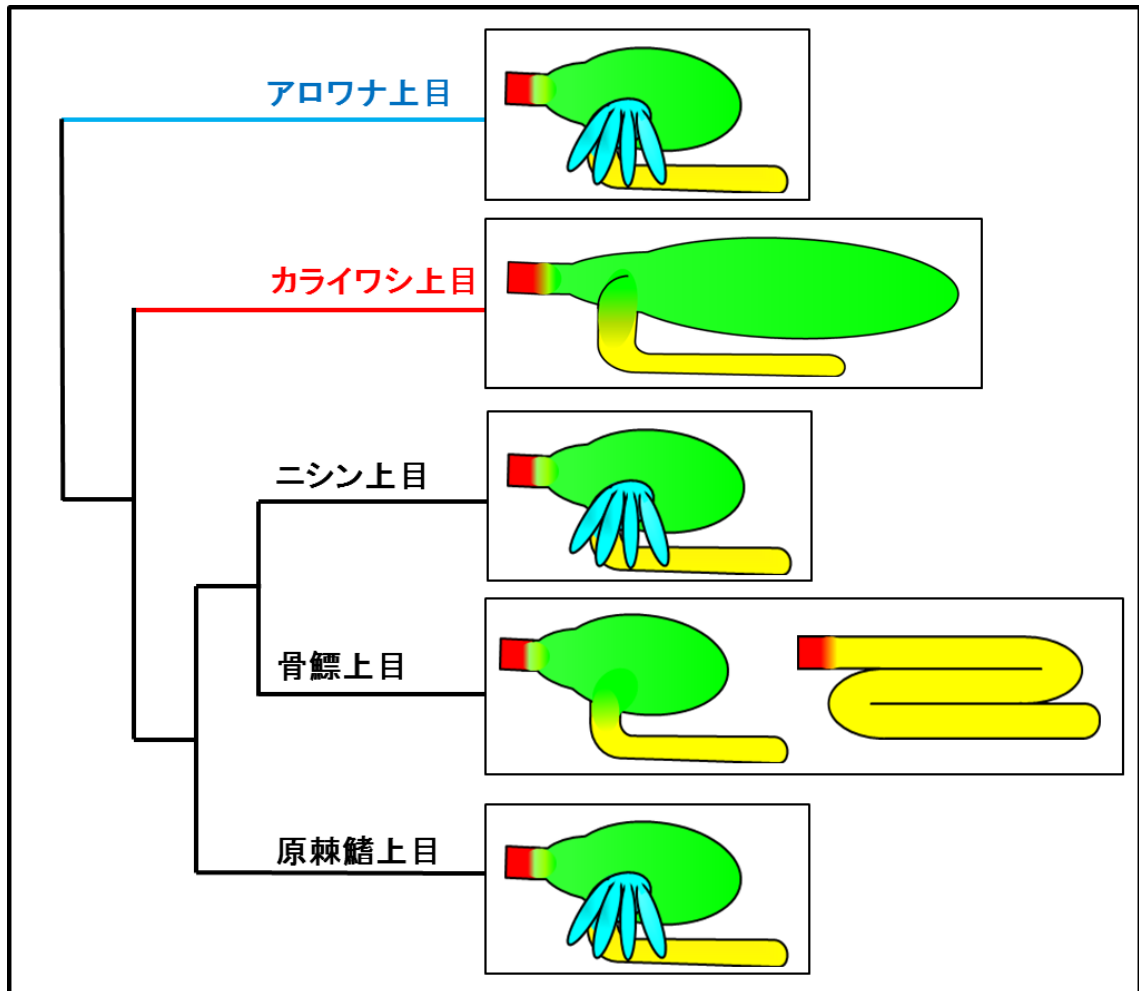
1996). いずれの領域も胃表層粘膜上皮細胞は中性及び酸性粘液を産生し、筋層は内輪走性と外縦走性の二層である (Clarke and Witcomb, 1980). 胃底部は粘膜固有層に胃腺が分布し、内腔には導管の開口が認められる (Ostos-Garrido et al., 1996). 幽門部に胃腺は無く、内輪走筋層は三部の中で最も発達している (Clarke and Witcomb, 1980). 腸は直線状で短く、腸後部と直腸を分離する弁が認められる (Kim et al., 2008). 腸粘膜は単層円柱上皮と杯細胞で構成されており、杯細胞には酸性及び中性粘液が含まれる (Yamada, 1975; Kužir et al., 2012). 上皮細胞の頂部には微絨毛が密生し、筋層は内輪走性と外縦走性の二層から成る (Clarke and Witcomb, 1980).

このようにカライワシ上目の研究はウナギ亜目によってのみ明らかにされているが、ウツボ亜目とアナゴ亜目はウナギ亜目と三亜目を構成する系統発生的に重要なグループであるにも関わらず、その知見は非常に少ない。特に盲嚢胃に関する知見は少なく、真骨類に通常認められる胃との相違も明確でない。本研究は、ウツボ亜目及びアナゴ亜目から代表種として、アセウツボ *Gymnothorax pictus* (Ahl, 1789) (ウツボ科ウツボ属) (Figure 4a) 及びマアナゴ *Conger myriaster* (Brevoort, 1856) (アナゴ科アナゴ属) (Figure 4b) をそれぞれ材料とし、これらの消化管について光学顕微鏡 (LM) 及び SEM 観察を行い、カライワシ上目ウナギ目の消化器系臓器の解剖学及び組織学的特徴を明らかにした。加えて、消化管内腔に分泌される粘液の組織化学的特徴についても明らかにした。このようにして明らかとした特徴に基づき、盲嚢胃に関する新たな知見を提供するとともに機能を推察し、また下位真骨類の進化におけるカライワシ上目ウナギ目の消化管の多様性について考察を試みた。

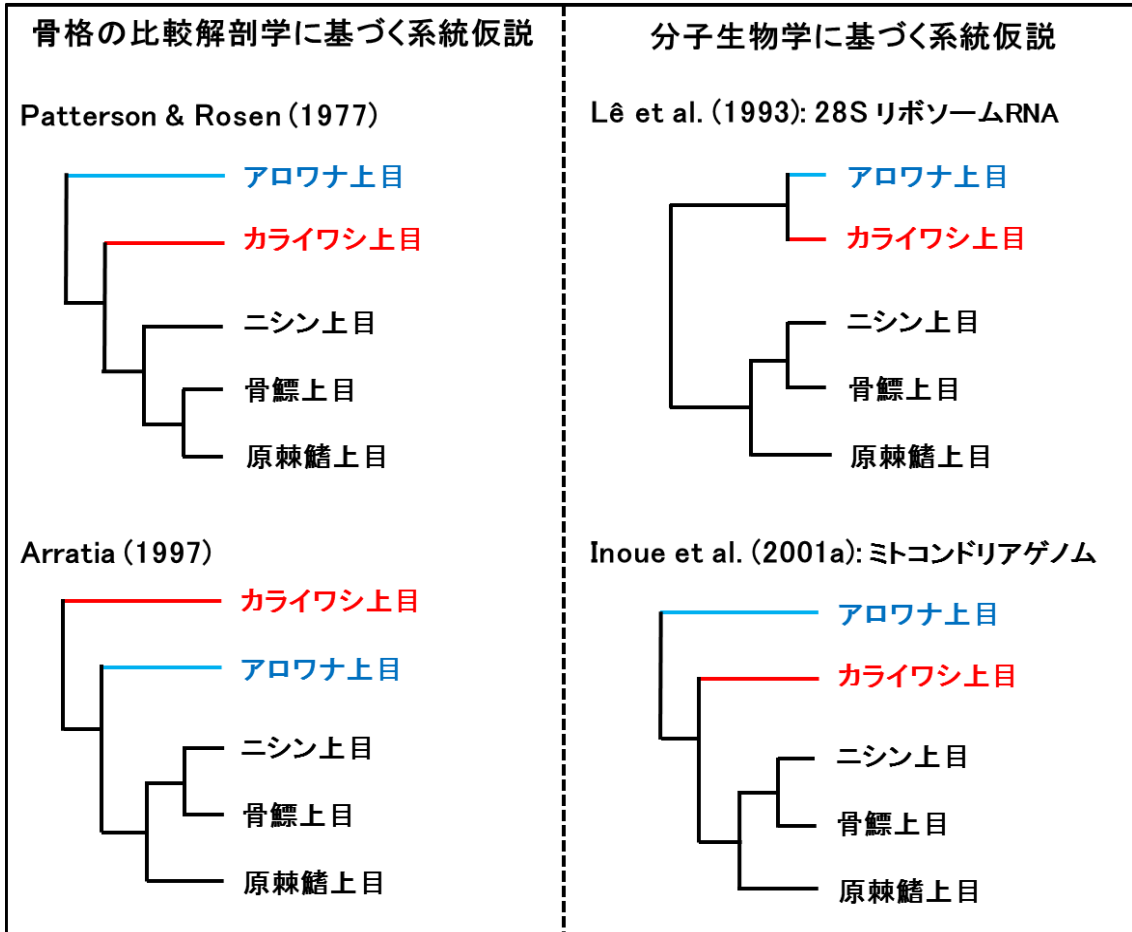


**Figure 1.** 両生綱及び硬骨魚類の消化管. **a)** 両生綱及び硬骨魚類における一般的な消化管の各器官を色分けした模式図. 赤, 緑, 紫, 青及び黄色の部分, それぞれ食道, 胃, 十二指腸, 幽門垂及び腸に相当する器官を示す. 両生綱は十二指腸を, 硬骨魚類は幽門垂を有する. **b)** 硬骨魚類に認められる消化管の各器官を色分けした模式図. 模式図の色は Figure 1a と同様の器官を示す. 有胃・有幽門垂, 有胃・無幽門垂及び無胃・無幽門垂の三種類が認められる.





**Figure 2.** 系統樹上に並べた下位真骨類各上目における消化管の模式図. 系統発生的な分岐に伴う多様化が認められる. カライワシ上目の消化管は有胃・無幽門垂タイプであるが, 長い盲嚢胃を有する特徴から胃を強調する模式図とした. 系統樹は Inoue et al. (2001a) に依った.



**Figure 3.** 下位真骨類各上目の系統発生的位置関係に対し提唱されている4つの系統仮説. 特にアロワナ上目とカライワシ上目のどちらが先に分岐したのかについて意見が分かれている.



**Figure 4.** 本研究に用いたウナギ目二種. **a)** ウツボ亜目アセウツボ (*Gymnothorax pictus*). 2010年11月に沖縄県西表島沿岸で採集された個体. スケールバー=5 cm. **b)** アナゴ亜目マアナゴ (*Conger myriaster*). 2012年9月に島根県中海で採集された個体. スケールバー=5 cm.

## 第2章

### ウツボ亜目ウツボ科アセウツボの消化管における組織学・組織化学的研究

#### 2-1 序論

現生硬骨魚類は系統発生的に多様に分岐し、また適応放散しており、進化をテーマとした研究に適している。脊椎動物の中では種類が非常に多く、分布も赤道域から極域まで、深海底から高高地の溪流や湖まで、海水から淡水まで広範囲に生息しており、食性及び行動様式もまた多様である。

消化器系臓器は食物の摂取、消化及び吸収といった重要な役割を果たす。一般的に硬骨魚類の消化器系は他の脊椎動物と同様に、消化管と肝臓や膵臓といった付属腺から構成されており、大部分の硬骨魚類の消化管は食道、胃、幽門垂及び腸から構成されている (Wilson and Castro, 2010)。

カライワシ上目に属する種の消化器系臓器に関する知見はウナギ目のみで報告されている。ウナギ科ヨーロッパウナギ及びニホンウナギの消化管は食道、胃及び腸から構成されており、幽門垂を欠いている。Y型の胃は盲嚢を形成する (Clarke and Witcomb, 1980)。胃は組織学的には噴門部、底部及び幽門部の三部に区分され、単層円柱状の表層上皮は全ての領域において酸性及び中性粘液を分泌する (Domeneghini et al., 2005)。筋層は内輪走層と外縦走層から構成されている (Clarke and Witcomb, 1980)。底部は胃腺を有し (Domeneghini et al., 2005)、内腔には導管の開口と上皮の特徴的な五角形のモザイク模様が認められる (Clarke and Witcomb, 1980)。幽門部は胃腺を欠いており (Domeneghini et al., 2005)、輪走筋層の厚みは最大になる (Clarke and Witcomb, 1980)。

腸はほぼ直線状で、直腸は弁によって分離されている (Clarke and Witcomb, 1980)。腸粘膜は単層円柱上皮と酸性及び中性粘液を内包する杯細胞で構成されている (Domeneghini

et al., 2005). 上皮細胞の頂部には導管及び微絨毛が見られ、筋層は内輪走層と外縦走層から構成されている (Clarke and Witcomb, 1980).

アロワナ上目から原棘鱗上目までは下位真骨類と呼ばれている. 各上目の系統発生的位置関係については、アロワナ上目が最初に分岐し、それに次いでカライワシ上目、ニシン上目が分岐したとする説がある (Patterson and Rosen, 1977; Inoue, et al., 2001a). 一方、カライワシ上目がアロワナ上目よりも先に分岐したとする説 (Arratia, 1997) や、アロワナ上目及びカライワシ上目が姉妹群として最初に分岐したとする説 (Lê et al., 1993) もある. 興味深いことに、ウナギ目の消化管が幽門垂を欠いている一方で、アロワナ上目 (Al-Mahrouki and Youson, 1998) 及びニシン上目 (Hossain and Dutta, 1996) はいずれも幽門垂を有しており、これら二上目は系統発生的にウナギ目を含むカライワシ上目の前後にそれぞれ位置している. しかし、幽門垂の有無が系統発生的位置の間で異なる理由についてはいまだ不明である.

本章では、ウツボ亜目アセウツボ *Gymnothorax pictus* (Ahl, 1789) (ウツボ科ウツボ属) の消化管を LM 及び SEM で観察することによって、胃と腸の形態を明らかにするとともにその機能を推察した. またそれらを系統発生的観点から評価することによって、特に胃と幽門垂の関係について考察した. 本研究における発見は今後のウナギ目における消化器系臓器に関する研究の基礎的な知見としてもまた有用であると思われる.

## 2-2 材料と方法

### 標本採集

12 個体のアセウツボの消化管を用いた。全ての個体は日本国沖縄県西表島の沿岸海域において、2007 年から 2012 年の 5 月から 11 月にかけて手網によって採集された。季節的ならびに成長的变化を考慮し、成魚段階の個体のみを用いた (平均体長  $62.8 \pm 7.64$  cm) (SD).

### 組織標本

アセウツボを 0.05% トリカインメタンスルホン酸 (MS-222, シグマアルドリッチ, 日本) を十分量溶解させた海水中で麻酔した後、開腹し内臓を一括して取り出した。消化管は 0.1M リン酸緩衝 4% パラフォルムアルデヒド (pH 7.4) または 0.1M リン酸緩衝 1.5% グルタルアルデヒド (pH 7.4) を翼状針により心臓経路で 15 分間灌流固定した後、内腔を同固定液により洗浄及び灌流した。消化管を更に 4°C で 3 日間浸漬固定した。

### 光学顕微鏡観察

4% パラフォルムアルデヒドで固定された消化管の食道、胃 (噴門部、体部、末端部及び幽門部) 及び腸 (前部、後部及び直腸) から小片を剃刀により切り出した。小片を洗浄及び脱水の後、パラフィンに包埋した。厚さ 4  $\mu\text{m}$  の薄切片を滑走式マイクロームにより作成し、ヘマトキシリン・エオジン (Hematoxylin-eosin: HE), アルシアン青 pH 2.5 (Alucian blue pH 2.5: AB, 酸性粘液を青色に染める) 及び過ヨウ素酸シッフ (Periodic acid schiff: PAS, 中性粘液を赤色に染める) でそれぞれ染色した。切片を光学顕微鏡 BX51 (オリンパス, 日本) によって観察ならびに写真撮影した。

## 走査型電子顕微鏡観察

1.5% グルタルアルデヒドで固定された消化管の食道，胃（噴門部，体部，末端部及び幽門部）及び腸（前部，後部及び直腸）から小片を剃刀によりそれぞれ切り出した．小片を洗浄及び脱水の後，2% タンニン酸及び1% オスミウム酸で導電染色し，*t*-ブチルアルコールとともに凍結乾燥した．試料を白金で被覆した後，走査型電子顕微鏡 S-4800（日立ハイテクノロジー，日本）により観察した．

## 2-3 結果

### 2-3-1 解剖学的観察

アセウツボの消化管は咽頭 (Pharynx: Pha), 食道 (Esophagus: Eso), 胃及び腸から構成されていた (Figure 5a). 胃幽門部 (Pyloric region of the Stomach: Sto. Py) に幽門垂は認められなかった. 食道平均長は  $8.30 \pm 0.33$  cm (平均体長  $62.8 \pm 7.64$  cm) であった. 胃は食道から連続する噴門部 (Cardiac region of the Stomach: Sto. Ca), 長い囊状の体部 (Body region of the Stomach: Sto. Bo) 及び末端部 (Terminal region of the Stomach: Sto. Te), 腸へ連続する幽門部に区分された. 胃末端部は胃体部と比べ白色調であった (Figure 5b). 腸はほぼ直線状で短く, その平均長は  $15.58 \pm 1.22$  cm であり, 平均体長との比は  $0.26 \pm 0.03$  であった. 腸は腸前部 (Anterior Intestine: Int. A), 腸後部 (Posterior Intestine: Int. P) 及び直腸 (Rectum: Re) に区分された. 腸後部内には複数の隔壁で構成された粘膜ひだが認められた (Figure 5c). 直腸は隔壁様粘膜ひだの後部に位置していた.

### 2-3-2 組織学的・組織化学的観察

#### 胃

##### 胃体部

胃体部は粘膜, 粘膜下組織, 筋層及び漿膜の四層で構成されていた. 粘膜上皮は単層円柱状細胞で構成されており, 管状の胃腺 (Gastric Glands: GG) が粘膜固有層に観察された (Figure 6a). 表層粘液及び頂部細胞質は AB (Figure 6b) 及び PAS (Figure 6c) 染色に対しいずれも陽性であった. 筋層は発達した内輪走性 (Circular Muscle: CM) 及び薄い外縦走性 (Longitudinal Muscle: LM) の二層で構成されていた (Figure 6d). SEM 像では多角形の上皮細胞から構成される波状のひだが観察され, 胃小窩の開口が上皮細胞間に認められた (Figure 7a). 微絨毛が各上皮細胞間及び頂部 (Apical surface: A) に認



められた (Figure 7b).

### 胃体部-胃末端部及び胃末端部

胃末端部は粘膜, 粘膜下組織, 筋層及び漿膜の四層で構成されていた. 胃体部-胃末端部において, 粘膜上皮は胃体部及び胃末端部のいずれにも連続して存在していた一方で, 胃腺 (Gastric Glands: GG) は胃末端部で消失していた (Figure 6e). 胃末端部の表層粘液及び頂部細胞質は AB (Figure 6f) 及び PAS (Figure 6g) 染色に対しいずれも陽性であった. 胃末端部の筋層は薄い内輪走性 (Circular Muscle: CM) 及び発達した外縦走性 (Longitudinal Muscle: LM) の二層で構成されており, 漿膜下組織も発達していた (Figure 6h). 胃末端部の SEM 像では多角形の上皮細胞から構成される直線状のひだが観察された (Figure 7c). 微絨毛は各上皮細胞間及び頂部 (Apical surface: A) に認められなかった (Figure 7d).

### 胃幽門部

胃幽門部は粘膜, 粘膜下組織, 筋層及び漿膜の四層で構成されていた. 粘膜上皮は単層円柱状細胞で構成されており, 胃腺は粘膜固有層に認められなかった (Figure 6i). 表層粘液及び頂部細胞質は AB (Figure 6j) 及び PAS (Figure 6k) 染色に対しいずれも陽性であった. 筋層は非常に発達した内輪走性 (Circular Muscle: CM) 及び薄い外縦走性 (Longitudinal Muscle: LM) の二層で構成されていた (Figure 6l). SEM 像では多角形の上皮細胞から構成される波状のひだが観察された (Figure 7e). 微絨毛が各上皮細胞間及び頂部 (Apical surface: A) に豊富に認められた (Figure 7f).

## 腸

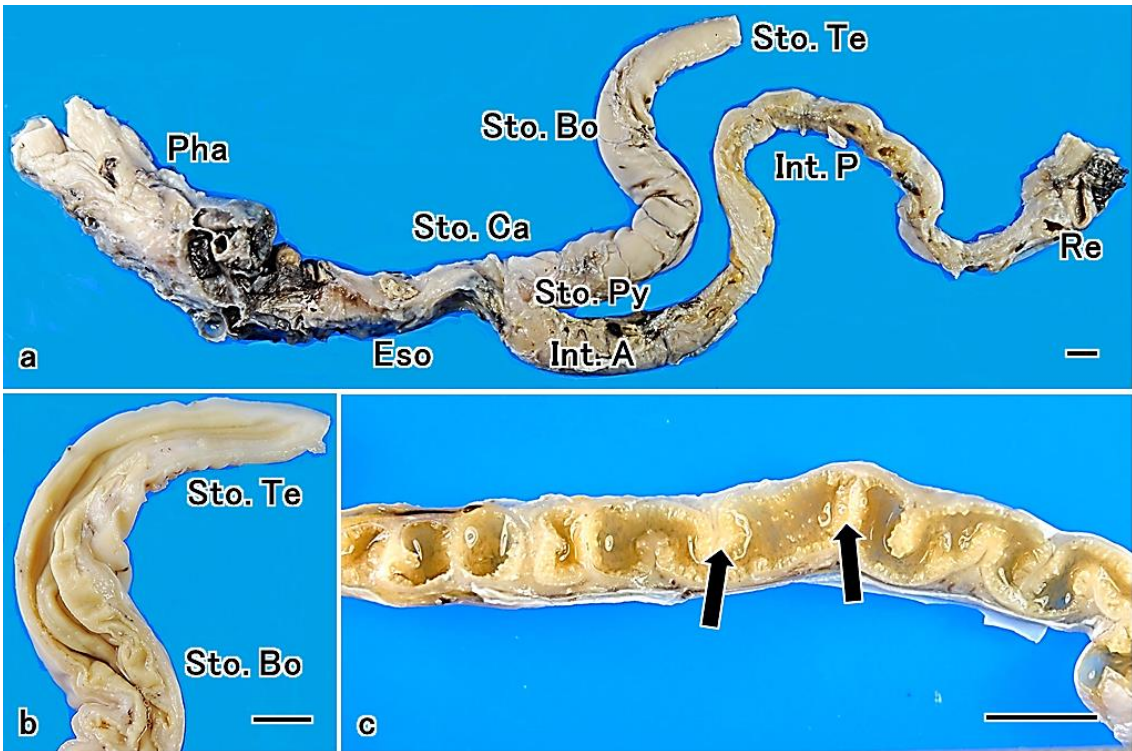
### 腸前部

腸前部は粘膜 (Mucosa: Mu), 粘膜下組織 (Submucosa: Sb), 筋層 (Muscle Layer: ML) 及び漿膜の四層で構成されていた (Figure 8a). 樹状の長い二次粘膜ひだが多く認められた. 粘膜上皮は単層円柱状細胞と少量の杯細胞で構成されていた (Figure 8b). 杯細胞中の粘液及び頂部細胞質は AB 陽性 (Figure 8c) であったが, PAS 陰性であった (Figure 8d). SEM 像では表面は刷子縁として腸細胞頂部を占める密な微絨毛に覆われており (Figure 9a), 微絨毛間には絨毛細胞由来の絨毛房が認められた (Figure 9b).

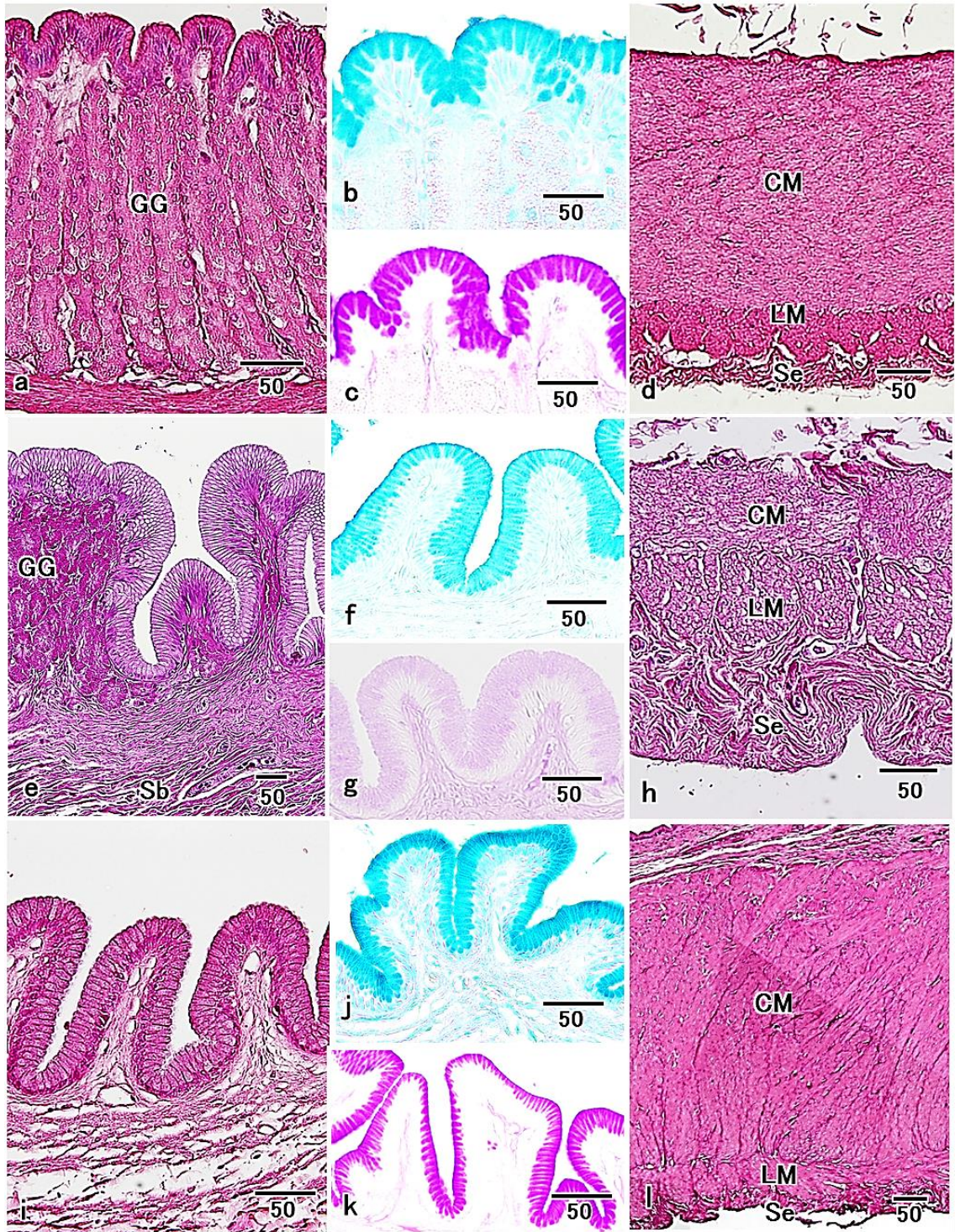
### 腸後部

腸後部は粘膜 (Mucosa: Mu), 粘膜下組織 (Submucosa: Sb), 筋層 (Muscle Layer: ML) 及び漿膜の四層で構成されていた (Figure 9e). 直線状の短い一次粘膜ひだが多く認められた. 粘膜上皮は単層円柱状細胞と多量の杯細胞で構成されていた (Figure 8f). 杯細胞中の粘液及び頂部細胞質は AB 陽性 (Figure 8g) であり, PAS には僅かに陽性であった (Figure 8h). SEM 像では表面は刷子縁として腸細胞頂部を占める密な微絨毛に覆われており (Figure 9c), 微絨毛間には絨毛細胞由来の絨毛房が認められた (Figure 9d). 絨毛細胞の密度は腸前部よりも高かった.

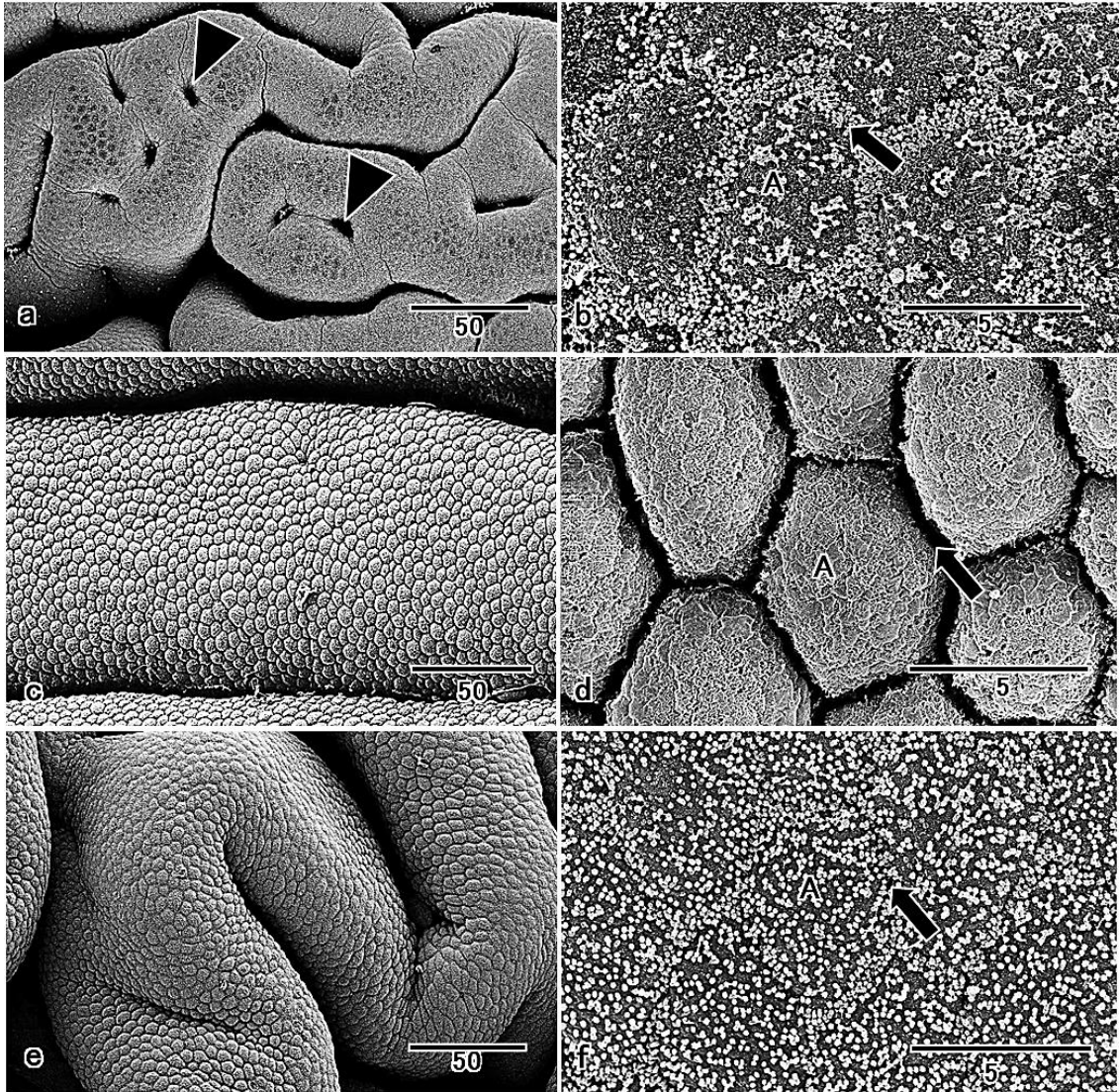
**Figure 5.** アセウツボ (*Gymnothorax pictus*) の消化管. Pha : 咽頭 (Pharynx), Eso : 食道 (Esophagus), Sto. Ca : 胃噴門部 (Cardiac region of the Stomach), Sto. Bo : 胃体部 (Body region of the Stomach), Sto. Te : 胃末端部 (Terminal region of the Stomach), Sto. Py : 胃幽門部 (Pyloric region of the Stomach), Int. A : 腸前部 (Anterior Intestine), Int. P : 腸後部 (Posterior Intestine), Re : 直腸 (Rectum). **a)** 全体像 (付属腺除去後). 消化管は食道, 長い盲嚢状の胃, 及び短い直線状の腸から構成されていた. スケールバー=10 mm. **b)** 胃体部-胃末端部の縦断面. 胃末端部は白色調であった. スケールバー=10 mm. **c)** 腸後部の縦断面. 複数の隔壁を構成する粘膜ひだ (矢印) が観察された. スケールバー=10 mm.



**Figure 6.** 胃の LM 像. a-d : 胃体部. **a)** 粘膜の横断面. 粘膜上皮は単層円柱状細胞で構成されており, 胃腺 (Gastric Glands: GG) が粘膜固有層に認められた. HE 染色. スケールバー=50  $\mu\text{m}$ . **b)** AB 染色. 表層粘液及び頂部細胞質は陽性であった. スケールバー=50  $\mu\text{m}$ . **c)** PAS 染色. 表層粘液及び頂部細胞質は陽性であった. スケールバー=50  $\mu\text{m}$ . **d)** 筋層の横断面. 発達した内輪走層 (Circular Muscle layer: CM) 及び薄い外縦走層 (Longitudinal Muscle layer: LM) が認められた. Sb : 粘膜下組織 (Submucosa), Se : 漿膜下組織 (Subserosa). HE 染色. スケールバー=50  $\mu\text{m}$ . e-h : 胃体部-胃末端部及び胃末端部. **e)** 胃体部-胃末端部の粘膜の縦断面. 胃腺 (Gastric Glands: GG) は胃末端部では消失していた. HE 染色. スケールバー=50  $\mu\text{m}$ . **f)** 胃末端部の AB 染色. 表層粘液及び頂部細胞質は陽性であった. スケールバー=50  $\mu\text{m}$ . **g)** 胃末端部の PAS 染色. 表層粘液及び頂部細胞質は陽性であった. スケールバー=50  $\mu\text{m}$ . **h)** 筋層の横断面. 薄い内輪走層 (Circular Muscle layer: CM) 及び発達した外縦走層 (Longitudinal Muscle layer: LM) が認められた. 漿膜下組織 (Subserosa: Se) も発達していた. HE 染色. スケールバー=50  $\mu\text{m}$ . i-l : 胃幽門部. **i)** 粘膜の縦断面. 粘膜上皮は単層円柱状細胞で構成されており, 胃腺は粘膜固有層に認められなかった. HE 染色. スケールバー=50  $\mu\text{m}$ . **j)** AB 染色. 表層粘液及び頂部細胞質は陽性であった. スケールバー=50  $\mu\text{m}$ . **k)** PAS 染色. 表層粘液及び頂部細胞質は陽性であった. スケールバー=50  $\mu\text{m}$ . **l)** 筋層の縦断面. 非常に発達した内輪走層 (Circular Muscle layer: CM) 及び薄い外縦走層 (Longitudinal Muscle layer: LM) が認められた. Se : 漿膜下組織 (Subserosa). HE 染色. スケールバー=50  $\mu\text{m}$ .

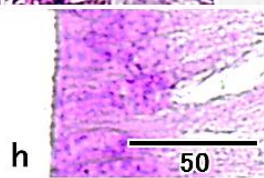
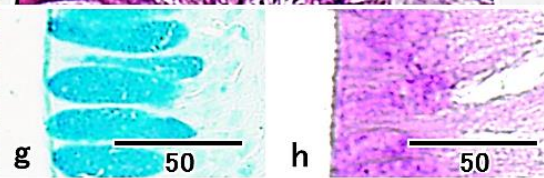
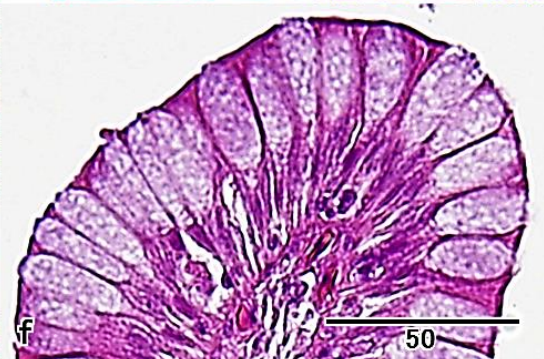
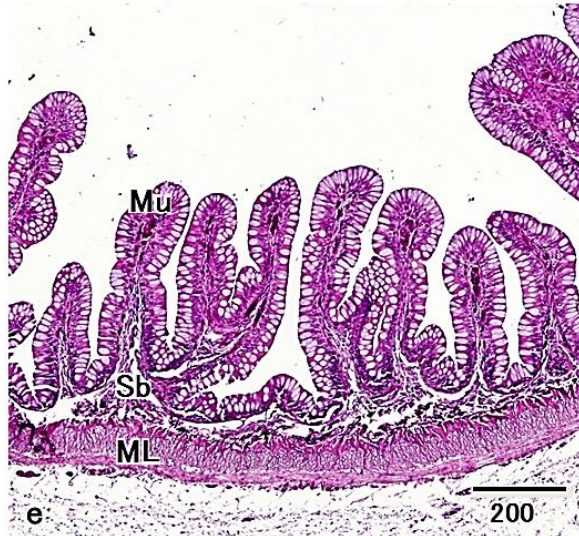
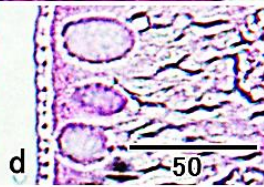
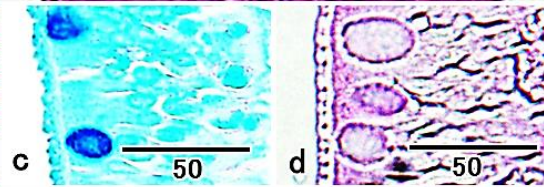
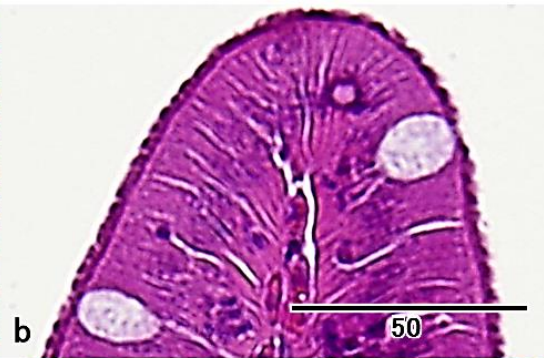
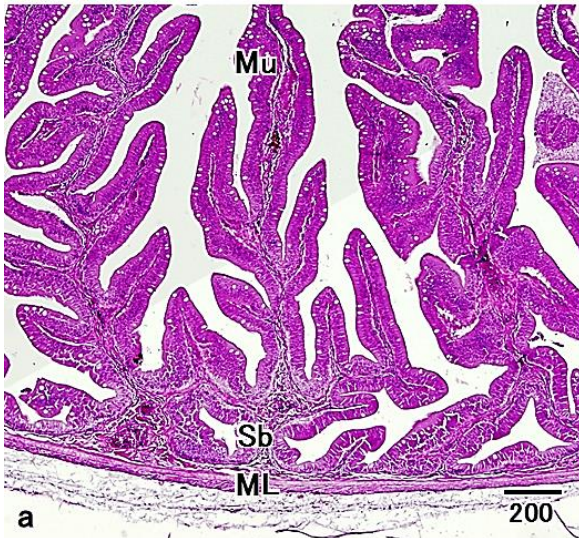


**Figure 7.** 胃の SEM 像. a-b : 胃体部. **a)** 波状のひだ及び胃小窩 (矢頭) が観察され, 表面は多角形の上皮細胞で占められていた. スケールバー=50  $\mu\text{m}$ . **b)** 微絨毛が上皮細胞頂部 (Apical surface: A) 及びその間 (矢印) に観察された. スケールバー=5  $\mu\text{m}$ . c-d : 胃末端部. **c)** 直線状のひだが観察され, 表面は多角形の上皮細胞で占められていた. スケールバー=50  $\mu\text{m}$ . **d)** 微絨毛は上皮細胞頂部 (Apical surface: A) 及びその間 (矢印) に認められなかった. スケールバー=5  $\mu\text{m}$ . e-f : 胃幽門部. **e)** 波状のひだが観察され, 表面は多角形の上皮細胞で占められていた. スケールバー=50  $\mu\text{m}$ . **f)** 微絨毛が上皮細胞頂部 (Apical surface: A) 及びその間 (矢印) に豊富に認められた. スケールバー=5  $\mu\text{m}$ .

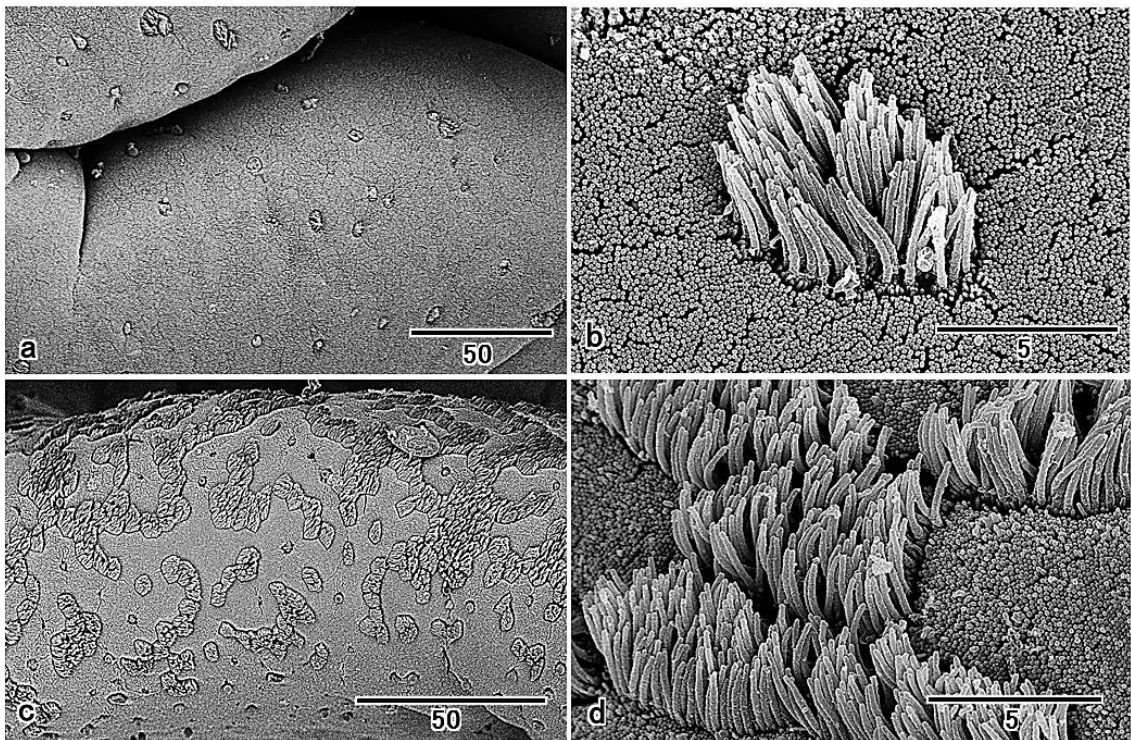




**Figure8.** 腸前部と腸後部の LM 像. a-b : 腸前部. **a)** 全体の横断像. 粘膜 (Mucosa: Mu), 粘膜下組織 (Submucosa: Sb), 筋層 (Muscle Layer: ML) 及び漿膜が観察された. 粘膜ひだは主に二次であった. HE 染色. スケールバー=200  $\mu\text{m}$ . **b)** 粘膜の横断面. 粘膜上皮は単層円柱状細胞及び少量の杯細胞で構成されていた. HE 染色. スケールバー=50  $\mu\text{m}$ . **c)** AB 染色. 表層粘液及び頂部細胞質は陽性であった. スケールバー=50  $\mu\text{m}$ . **d)** PAS 染色. 表層粘液及び頂部細胞質は陰性であった. スケールバー=50  $\mu\text{m}$ . e-f : 腸後部. **e)** 全体の縦断像. 粘膜 (Mucosa: Mu), 粘膜下組織 (Submucosa: Sb), 筋層 (Muscle Layer: ML) 及び漿膜が観察された. 粘膜ひだは主に一次であった. HE 染色. スケールバー=200  $\mu\text{m}$ . **f)** 粘膜の縦断面. 粘膜上皮は単層円柱状細胞及び多量の杯細胞で構成されていた. HE 染色. スケールバー=50  $\mu\text{m}$ . **g)** AB 染色. 表層粘液及び頂部細胞質は陽性であった. スケールバー=50  $\mu\text{m}$ . **h)** PAS 染色. 表層粘液及び頂部細胞質は僅かに陽性であった. スケールバー=50  $\mu\text{m}$ .



**Figure 9.** 腸前部と腸後部の SEM 像. a-b : 腸前部. **a)** 表面は密な微絨毛で覆われていた. スケールバー=50  $\mu\text{m}$ . **b)** 絨毛細胞由来の絨毛房が微絨毛間に認められた. スケールバー=5  $\mu\text{m}$ . c-d : 腸後部. **c)** 表面は密な微絨毛で覆われていた. スケールバー=50  $\mu\text{m}$ . **d)** 絨毛細胞細胞由来の絨毛房が微絨毛間に認められ, それらの密度は腸前部よりも高かった. スケールバー=5  $\mu\text{m}$ .



## 2-4 考察

アセウツボの消化管は幽門垂を欠いていた。しかし幽門垂は大多数の有胃魚が有しており、全ての無胃魚に無い (Hossain and Dutta, 1996)。加えて、胃腺と幽門垂の分化は概ね消化管の発生において最終段階に起こる (García et al., 2001; Chen et al., 2006)。故に胃と幽門垂の間には密接な関連性が存在すると考えられている (Wilson and Castro, 2010) が、その詳細は不明である。アセウツボと同様に幽門垂を欠く有胃魚種として、ウナギ目ウナギ科ヨーロッパウナギ (Clarke and Witcomb, 1980; Domeneghini et al., 2005) 及びニホンウナギ (城と佐々木, 2010)、ナマズ目ナマズ科アメリカナマズ *Ictalurus punctatus* (Sis et al., 1979) 及びニホンナマズ *Silurus asotus*、トゲウオ目トゲウオ科イトヨ *Gasterosteus aculeatus* (Hale, 1965) や、スズキ目オオカミウオ科オオカミウオ *Anarhichas lupus* (Hellberg and Bjerkås, 2000) が報告されている。これらの種の胃は幽門垂を有する他の種の胃と異なる特徴を持つ可能性が示唆された。

組織学的に、アセウツボの胃は噴門部、体部、末端部及び幽門部に区別された。本種の胃噴門部、体部及び幽門部における組織学的特徴は大多数の硬骨魚類における胃噴門部、体部及び幽門部における組織学的特徴とそれぞれ同様であった (Anderson, 1986; Grau et al., 1992; Caceci et al., 1997)。一方、胃末端部は他の三領域とは異なる特有の組織学的特徴を示し、胃腺及び微絨毛を欠いており、発達した縦走筋層と漿膜下組織を有していた。これらの特徴に基づくと、アセウツボの胃末端部は特別な働きを示す可能性が考えられた。通常、胃における筋層は縦走筋層と比較し発達した輪走筋層を有している (Anderson, 1986)。輪走筋細胞の収縮は消化管径を収縮させ、栄養物の混合及び破碎に関与している (Dean and Padykula, 1966)。輪走筋層は幽門部で最も発達しており、胃と腸を区分する幽門括約筋として知られている (Sis et al., 1979; Albrecht, 2001)。一方、縦走筋細胞の収縮は消化管長を短縮させる (ローマーとパーソンズ, 2007)。本研究でアセウツボの胃末端部において観察され

た発達した縦走筋層は、この領域で縦走筋細胞の顕著な弛緩及び収縮が起こる可能性を示唆していた。故に、丸ごとの魚といった大きな栄養物が胃体部へ運搬されてきた際に、胃末端部は縦走筋細胞を十分に弛緩させることによって、それらの貯留を可能にすると思われた。一方、胃において食物が十分に消化された後は、胃末端部の縦走筋細胞は収縮することによって、恐らく消化物を胃幽門部へ運搬する手助けとなると思われた。胃末端部における胃腺の欠如は、この領域における縦走筋細胞の顕著な弛緩及び収縮という可能性と強く関連しているかもしれない。

本種は腸後部に複数の隔壁様粘膜ひだを有していた。腸螺旋弁は粘膜上皮と結合組織から構成される粘膜ひだとして知られており、軟骨魚綱 (Chatchavalvanich, 2006)、肺魚亜綱 (Icardo et al., 2010) 及び分岐鰭亜綱 (Abdel, 1975) などが有している。その構造は腸管の一端から他端まで伸長した粘膜ひだが腸管壁に沿って螺旋状にねじれ (ローマーとパーソンズ, 2007)、複数の憩室を形成することで特徴づけられる。本研究でアセウツボの隔壁様粘膜ひだから得られた解剖学的及び組織学的構造は螺旋弁とは少し異なっていたが、螺旋弁に認められる複数の憩室構造を有していた。螺旋弁は内腔の吸収面積の増大や栄養物の滞留の延長によって消化効率を高めているとされている (Chatchavalvanich et al., 2006)。このことから隔壁様粘膜ひだは螺旋弁と類似の機能を有していると推察された。また隔壁様粘膜ひだの上皮には絨毛細胞由来の絨毛房が多く認められた。一般的に、絨毛細胞は咽頭や卵管に分布し物質の運搬に関連している (ローマーとパーソンズ, 2007)。絨毛細胞は肺魚亜綱 (Purkerson et al., 1975) や分岐鰭亜綱 (Burkhardt-Holm and Holmgren, 1992) といった特定の硬骨魚類の腸においても観察されている。故に、隔壁様粘膜ひだの絨毛細胞は消化物の運搬を補助するために分布していると推察された。本種の腸における、隔壁様粘膜ひだ及び絨毛細胞以外の組織学的特徴は大多数の硬骨魚類の腸で報告されている特徴と同一であった (Hale, 1965; Ezeasor and Stokoe, 1980; Morrison and Wright, 1999)。

消化管内腔に分泌される粘液はそれを構成する糖タンパク質の種類によって酸性及び

中性に分けられる (Bakke et al., 2010). 酸性粘液がアセウツボの消化管全体を通して分泌されていた。胃の表層粘膜上皮細胞から分泌される酸性粘液はヨーロッパウナギ (カライワシ上目) で報告されている (Domeneghini et al., 2005). 粘液は内容物や酵素によって生じる機械的及び化学的損傷から粘膜上皮を保護し (Manjakasy et al., 2009), また外来物内の細菌に対抗する免疫グロブリンを含み生体防御の仲介という役割も担う (Swan et al., 2008). 酸性粘液を構成する酸性糖タンパク質はプロテアーゼや細菌による粘液の分解を抑制したり (Neuhaus et al., 2007), 粘液の粘度や接着性の増加によって水溶性の微小な食物粒子の吸収を補助したりする (Tibbets, 1997). 酸性粘液はまた表層における酸性環境下の形成に貢献しているかもしれない。酸性プロテアーゼであるペプシンは強酸性環境下において最も高い活性を示す (Xiong et al., 2011). 更に Pérez-Jiménez ら (2009) は *Dentex dentex* の幽門垂及び腸の低 pH 領域に、酸性環境で活性の高いカテプシンといったリソソームプロテアーゼ群が集中している可能性を示唆した。故に本種の消化管全体に分泌されている酸性粘液は酸性プロテアーゼの活性を促進している可能性が考えられた。

アセウツボの胃で観察された胃末端部構造ならびに酸性粘液の分泌は、幽門垂を有する有胃魚では今のところ報告されていない。したがって、この特徴は幽門垂を欠く有胃魚に特有である可能性が示唆された。本種の腸で観察された隔壁様粘膜ひだは螺旋弁と同様に複数の憩室構造を有し、その上皮には繊毛細胞が並んでいた。螺旋弁と繊毛細胞はいずれも下位真骨類より以前に分岐した種の腸で報告されている。本種の腸の構造は下位真骨類より以前に分岐した種における腸と関連性が高いかもしれない。アロワナ上目 (Al-Mahrouki and Youson, 1998) 及びニシン上目 (Hossain and Dutta, 1996) がいずれも幽門垂を有している一方で、アセウツボが幽門垂を欠いており、また下位真骨類以前に分岐した種に類似する腸を有することは、カライワシ上目がアロワナ上目よりも先に分岐したとする Arratia の系統仮説 (1997) を支持する可能性があると考えられた。

## 第3章

### アナゴ亜目アナゴ科マアナゴの消化管における組織学・組織化学的研究

#### 3-1 序論

カライワシ上目は下位真骨類から上位真骨類を繋ぐ系統発生的にユニークな種から構成される。カライワシ上目はカライワシ目、ソトイワシ目、ウナギ目及びフウセンウナギ目に適応放散しており (Nelson, 1994; Inoue et al., 2004), 進化の研究に適している。ウナギ目はカライワシ上目の中で最も多様な目であり、三亜目 (ウツボ亜目, アナゴ亜目及びウナギ亜目) に分類され (Robins, 1989; Inoue et al., 2001b), 赤道域から極域, 深海底から溪流域, 海水から淡水まで広範囲に生息する。食性もまた多様であることから, ウナギ目は消化器系臓器の進化を考える上で重要な位置を占める。

カライワシ上目の消化器系臓器構成は特徴的であり, 真骨類の多くの魚種は胃と幽門垂の両方を有する (Hossain and Dutta, 1996) にも関わらず, 下位真骨類のカライワシ上目は大型の盲嚢胃のみを有し幽門垂は存在しない (Kužir et al., 2012)。カライワシ上目の中でもウナギ亜目の胃は噴門部, 底部及び幽門部に組織学的に区分される (Clarke and Witcomb, 1980)。ウツボ亜目アセウツボ *Gymnothorax pictus* の胃はこれらの三領域に加え, 胃末端部を有する (第2章)。胃末端部は発達した縦走筋層と漿膜下組織によって特徴づけられ, 胃腺を欠如することから, 第2章においてこの組織構築は大きな栄養体の貯蔵及び運搬に関連すると推察した。ウナギ亜目及びアセウツボの胃幽門部は胃腺を欠き, 胃の中で最も発達した輪走筋層を有する (Ostos-Garrido et al., 1996)。

ウナギ亜目の腸後部は弁により直腸と区別されている (Clarke and Witcomb, 1980)。アセウツボには腸後部内に複数の隔壁様粘膜ひだが認められるが, これらはウナギ亜目には欠如している (Kim et al., 2008)。粘膜上皮細胞頂部には微絨毛が刷子縁として密に分布する



(Clarke and Witcomb, 1980). 第2章で述べたようにアセウツボの腸では繊毛細胞が粘膜上皮細胞間に存在するが、ウナギ亜目でこのような構造の報告はされていない。

消化管の粘膜は常に粘液を上皮表面に分泌している。ウナギ亜目の胃表層粘膜上皮細胞は中性及び酸性粘液を産生し (Domeneghini et al., 2005), この特徴はアセウツボの胃においても同様である。ウナギ亜目の腸杯細胞中の粘液もまた中性及び酸性両方から構成される (Yamada, 1975) が、アセウツボの腸は酸性粘液を優勢的に含む (第2章参照)。

このように、ウナギ目の中でもウツボ亜目とウナギ亜目では消化管を構成する細胞及び組織構造は異なっている。しかしながら、これまでのウナギ目の消化管の解剖及び組織学的知見は、ウナギ亜目においては豊富であるが、ウツボ亜目ではアセウツボのみ (第2章参照) と限られている。また系統発生的に両者の間に位置するとされるアナゴ亜目は、漁獲や養殖に関わる研究は幾つかされているが、消化管の組織構築などを明らかにした報告はまだ無い。

本章では、アナゴ亜目マアナゴ *Conger myriaster* (Brevoort, 1856) (アナゴ科アナゴ属) の消化管における形態学的ならびに組織化学的特徴について LM 及び SEM 観察により明らかにし、それらを系統発生的観点から評価することで、カライワシ上目の消化器系臓器の多様性について考察した。

## 3-2 材料と方法

### 標本

12 個体のマアナゴの消化管を用いた。全ての個体は日本国島根県中海において 2003 年から 2012 年の 6 月から 11 月にかけて魚網によって採集された。季節及び成長による変化の影響を考慮し、成魚段階の標本 (平均体長  $54.7 \pm 3.37$  cm, 平均体重  $233.8 \pm 36.58$  g) のみを使用した。

### 組織標本

マアナゴを 0.05% トリカインメタンスルホン酸 (MS-222, シグマアルドリッチ, 日本) を十分量溶解させた海水中で麻酔した後、開腹し内臓を一括して取り出した。消化管は 0.1M リン酸緩衝 4% パラフォルムアルデヒド (pH 7.4) または 0.1M リン酸緩衝 1.5% グルタルアルデヒド (pH 7.4) を翼状針により心臓経路で 15 分間灌流固定した後、内腔を同固定液により洗浄及び灌流した。消化管を更に 4°C で 3 日間浸漬固定した。

### 光学顕微鏡観察

4% パラフォルムアルデヒドで固定された消化管の食道、胃 (噴門部、体部、末端部及び幽門部) 及び腸 (前部、後部及び直腸) から小片を剃刀により切り出した。小片を洗浄及び脱水の後、パラフィンに包埋した。厚さ 4  $\mu$ m の薄切片を滑走式マイクロトームにより作成し、ヘマトキシリン・エオジン (Hematoxylin-eoin: HE) 染色を行なった。また切片にヒト唾液によるジアスターゼ消化処理 (室温, 10 分) を行ない蒸留水で洗浄した後、アルシアン青 pH 2.5 (Alucian blue: AB) と過ヨウ素酸シッフ (Periodic acid schiff: PAS) の二重染色 (AB/PAS) を行なった。この方法では、酸性粘液は AB によって青色に、中性粘液及びグリコーゲン (PAS) によって赤色に染色されるが、消化管に含まれるグリコーゲ

ンは唾液中のジアスターゼにより消化されるため中性粘液のみが検出される。切片を光学顕微鏡 BX51 (オリンパス, 日本) によって観察ならびに写真撮影した。

### 走査型電子顕微鏡観察

1.5% グルタルアルデヒドで固定された消化管の食道, 胃 (噴門部, 体部, 末端部及び幽門部) 及び腸 (前部, 後部及び直腸) から小片を剃刀によりそれぞれ切り出した。小片を洗浄及び脱水の後, 2% タンニン酸及び1% オスミウム酸で導電染色し, *t*-ブチルアルコールとともに凍結乾燥した。試料を白金で被覆し, 走査型電子顕微鏡 S-4800 (日立ハイテクノロジー, 日本) を用いて観察した。

### 3-3 結果

#### 3-3-1 解剖学的観察

マアナゴの消化管は咽頭 (Pharynx: Pha), 食道 (Esophagus: Eso), 胃及び腸から構成されていた (Figure 10a). 胃幽門部 (Pyloric region of the Stomach: Sto. Py) に幽門垂は認められなかった. 食道の平均長は  $3.3 \pm 1.06$  cm であり, 色は白色であった. 胃は食道から連続する噴門部 (Cardiac region of the Stomach: Sto. Ca), 長い盲囊の体部 (Body region of the Stomach: Sto. Bo) と末端部 (Terminal region of the Stomach: Sto. Te) 及び腸へ連続する幽門部の四部に区別された. 胃末端部の色は体部と異なり白色であった (Figure 10b). 腸はほぼ直線状で短く, その平均長は  $13.7 \pm 3.53$  cm であり, 腸平均腸と平均体長との比は  $0.26 \pm 0.06$  であった. 腸は腸前部 (Anterior Intestine: Int. A), 腸後部 (Posterior Intestine: Int. P) 及び直腸 (Rectum: Re) に区分された. 腸後部の粘膜ひだの長さは前部に比べ短く, 腸前部から腸後部への移行は明瞭であった. 全ての個体において隔壁様粘膜ひだが腸後部の末端側内に 1 本観察された (Figure 10c). 2 本の粘膜ひだで構成される直腸弁が隔壁様粘膜ひだ以後に観察された.

#### 3-3-2 組織学的観察

##### 食道

食道は粘膜 (Mucosa: Mu), 粘膜下組織 (Submucosa: Sb), 筋層及び漿膜の四層で構成されていた (Figure 11a). 粘膜ひだは大部分が一次であり二次は希少であった. 粘膜上皮は重層細胞で構成されており, 豊富な囊状粘液細胞が上皮細胞間に観察された (Figure 11b). 筋層は内縦走性 (Inner Longitudinal Muscle layer: ILM) (Figure 11c) と外輪走性 (Outer Circular Muscle layer: OCM) (Figure 11d) の二層で構成され, これらにはいずれも横紋構造が認められた. SEM 像では, 多角形の上皮細胞頂部 (Apical surface: A) は指

紋状の微小隆起を有しており，囊状粘液細胞及び粘液が上皮細胞間に観察された (Figure 11e).

## 胃

### 食道-胃噴門部

粘膜上皮は食道の重層細胞及び囊状粘液細胞から胃噴門部の単層円柱状細胞に変化していた (Figure 12a). 食道における内縦走横紋筋層 (Inner Longitudinal Muscle layer: ILM) は粘膜の変化以後も引き続き観察された. 対照的に外輪走横紋筋層 (Outer Circular Muscle layer: OCM) は粘膜の変化に伴い消失し，それは胃噴門部における中輪走平滑筋層 (Middle Circular Muscle layer: MCM) の開始の境界と一致していた (Figure 12a).

### 胃噴門部

胃噴門部は粘膜，粘膜下組織 (Submucosa: Sb)，筋層及び漿膜の四層で構成されていた. 粘膜上皮は単層円柱状細胞から構成されており，胃腺は粘膜固有層に観察されなかった. 筋層は内縦走性 (Inner Longitudinal Muscle layer: ILM)，中輪走性 (Middle Circular Muscle layer: MCM) 及び外縦走性 (Outer Longitudinal Muscle layer: OLM) の三層であった (Figure 12b). 内縦走層は横紋筋から，中輪走層及び外縦走層は平滑筋からそれぞれ構成されていた.

### 胃体部

胃体部は粘膜，粘膜下組織 (Submucosa: Sb)，筋層及び漿膜の四層で構成されていた (Figure 12c). 粘膜上皮は単層円柱状細胞で構成されており，胃小窩が上皮細胞間に観察された. 胃小窩に連続する管状の胃腺 (Gastric Glands: GG) が粘膜固有層内に観察

された。筋層は内縦走性 (Inner Longitudinal Muscle layer: ILM) (Figure 12d), 中輪走性 (Middle Circular Muscle layer: MCM) 及び外縦走性 (Outer Longitudinal Muscle layer: OLM) (Figure 12e) の三層で構成されていた。内縦走層は横紋筋性で、それらは胃噴門部に比べ断続的であり胃盲嚢の先端に進むに連れて消失した。中輪走層及び外縦走層はいずれも平滑筋性であった。中輪走層は外縦走層より発達しており胃壁の大部分を占めていた。

### 胃体部-胃末端部及び胃末端部

胃末端部は粘膜, 粘膜下組織, 筋層及び漿膜の四層で構成されていた。胃体部-胃末端部の粘膜上皮は両領域に連続して存在していたが, 胃腺 (Gastric Glands: GG) は胃末端部では消失していた (Figure 12f)。胃末端部の筋層は内輪走性 (Circular Muscle layer: CM) と外縦走性 (Longitudinal Muscle layer: LM) の二層から構成されており, 胃体部の筋層に比べて内輪走層は薄く外縦走層は発達していた (Figure 12g)。胃末端部では漿膜下組織もまた発達しており, 内部の血管が明瞭に観察された。

### 胃幽門部

胃幽門部は粘膜, 粘膜下組織, 筋層及び漿膜の四層で構成されていた。粘膜上皮は単層円柱上皮で構成されており, 胃腺は粘膜固有層に認められなかった。筋層は内輪走性と外縦走性の二層から構成されており, 胃体部の筋層に比べ二層いずれも発達していた。

## 腸

### 腸前部

腸前部は粘膜 (Mucosa: Mu), 粘膜下組織 (Submucosa: Sb), 筋層 (Muscle Layer: ML)

及び漿膜の四層で構成されていた (Figure 13a). 粘膜ひだはよく分枝し樹状の二次ひだが多く観察された. 粘膜上皮は刷子縁を頂部に有する単層円柱状細胞と少量の杯細胞で構成されていた (Figure 13b). 筋層は内輪走性と外縦走性の二層から構成されていた. SEM 像では, 粘膜ひだは頂部に密な微絨毛を有する多角形の粘膜上皮細胞から構成されており, 腸細胞間には絨毛細胞由来の絨毛房が観察された (Figure 13c). 絨毛細胞は粘膜ひだの頂部付近に集中する傾向にあった.

### 腸後部

腸後部は粘膜 (Mucosa: Mu), 粘膜下組織 (Submucosa: Sb), 筋層 (Muscle Layer: ML) 及び漿膜の四層で構成されていた (Figure 13d). 粘膜ひだの分枝は少なく直線状の一次ひだが多く観察された. 粘膜上皮は刷子縁を頂部に有する単層円柱状細胞と多量の杯細胞で構成されていた (Figure 13e). 筋層は内輪走性と外縦走性の二層から構成されておりいずれも薄かった. SEM 像では, 粘膜ひだは頂部に密な微絨毛を有する多角形の粘膜上皮細胞で構成されており, 腸細胞間には絨毛細胞由来の絨毛房が観察された (Figure 13f). 絨毛細胞は粘膜ひだの頂部付近に集中する傾向にあり, その密度は腸前部よりも明瞭に高かった.

### 3-3-3 組織化学的観察

ジアスターゼ消化処理後の PAS 染色は, 試験した消化管の全ての領域においてグリコーゲンは残存しておらず, 中性粘液のみが反応していることを示した.

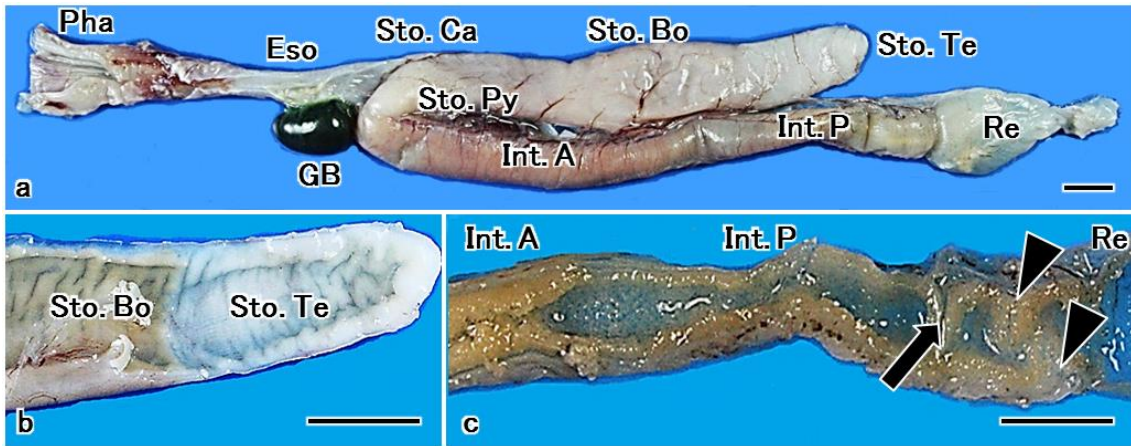
胃表層粘膜上皮細胞は AB/PAS 染色に対し青紫または赤紫に染色され, いずれも酸性と中性の混合粘液を含んでいたが, その比率は胃の領域ごとに異なっていた. 胃噴門部では青紫に染色された (Figure 14a). 胃体部では赤紫に染色され中性粘液が多く含まれていたが, 胃小窩の頸部細胞は青紫に染色された (Figure 14b). 胃末端部の表層粘膜上皮細胞

胞は青紫を示し酸性粘液がより含まれていた (Figure 14c) が、胃幽門部では赤紫に染色され中性粘液が優勢であった (Figure 14d).

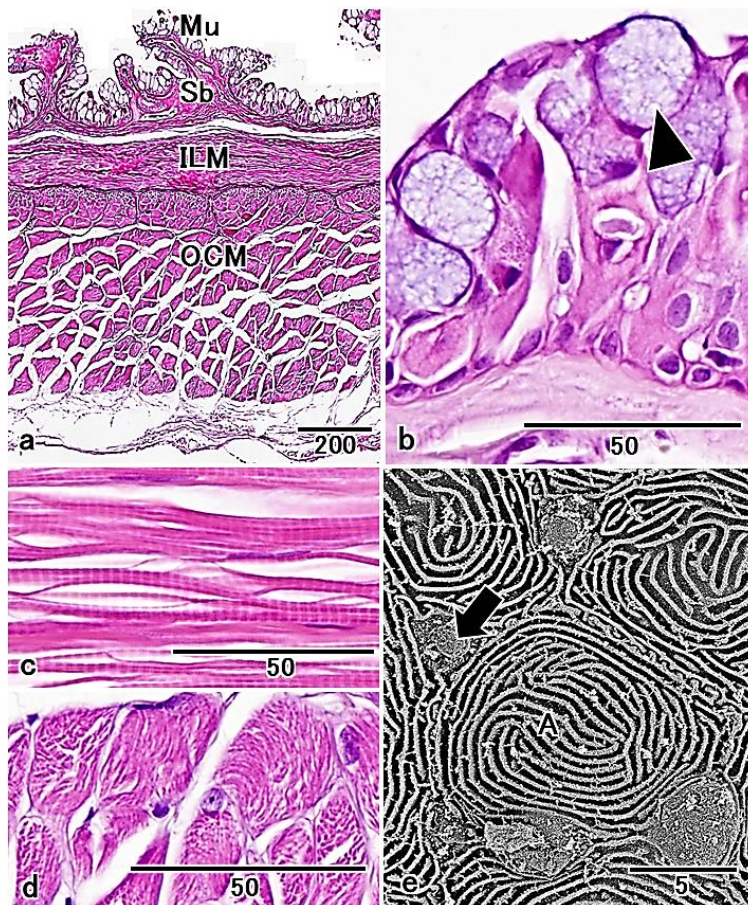
腸前部と腸後部では、いずれも全ての杯細胞中の粘液は青紫に染色され、酸性と中性の混合粘液を含んでいた (Figure 14e 及び f).



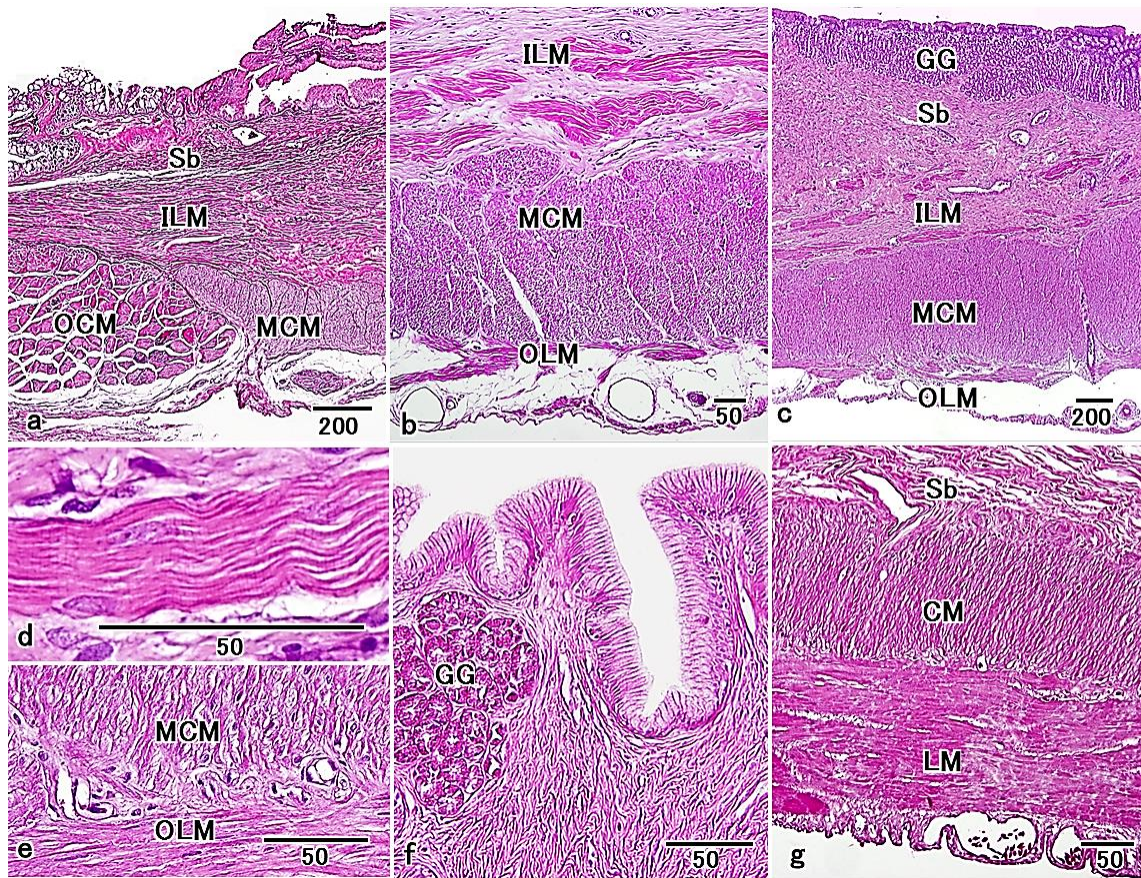
**Figure 10.** マアナゴ (*Conger myriaster*) の消化管. Pha : 咽頭 (Pharynx), Eso : 食道 (Esophagus), GB : 胆嚢 (Gall Bladder), Sto. Ca : 胃噴門部 (Cardiac region of the Stomach), Sto. Bo : 胃体部 (Body region of the Stomach), Sto. Te : 胃末端部 (Terminal region of the Stomach), Sto. Py : 胃幽門部 (Pyloric region of the Stomach), Int. A : 腸前部 (Anterior Intestine), Int. P : 腸後部 (Posterior Intestine), Re : 直腸 (Rectum). **a)** 全体像 (付属腺除去後). 消化管は食道, 長い盲嚢状の胃及び短い直線状の腸から構成されていた. スケールバー=10 mm. **b)** 胃体部-胃末端部の縦断面. 胃末端部は胃体部に比べて白色調であった. スケールバー=10 mm. **c)** 腸前部-腸後部-直腸の縦断面. 1本の隔壁様粘膜ひだ (矢印) 及び直腸弁 (矢頭) が認められた. スケールバー=10 mm.



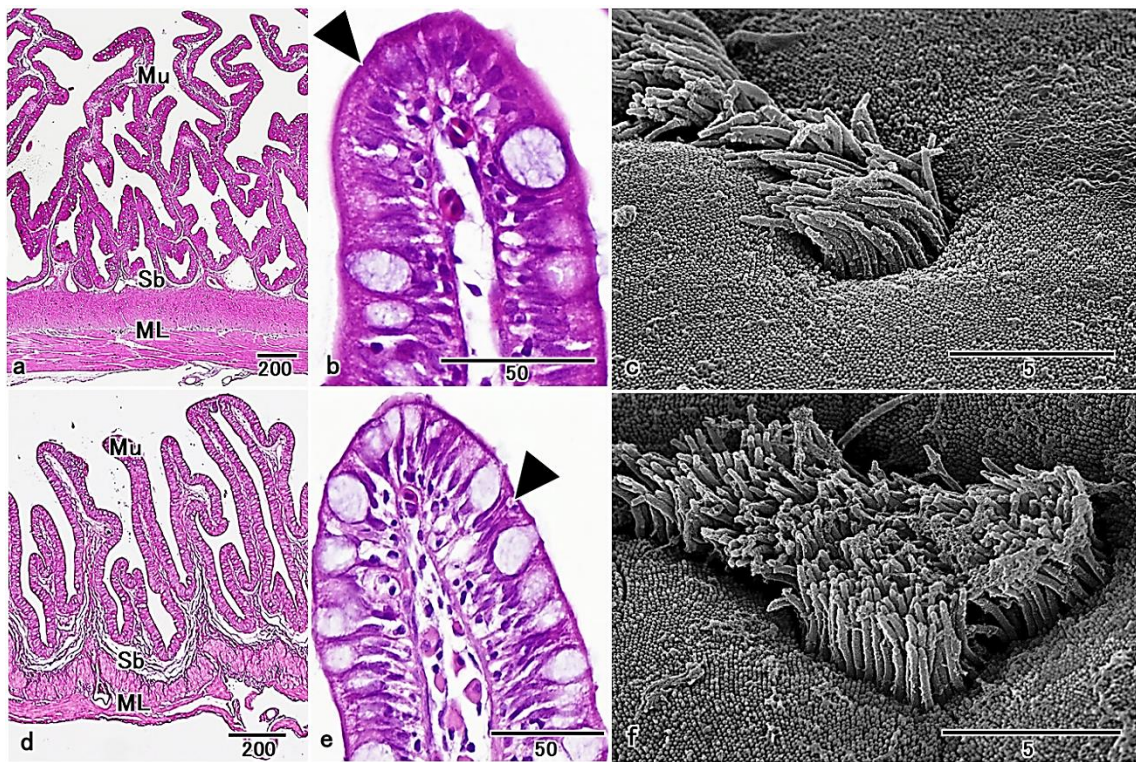
**Figure 11.** 食道の LM 及び SEM 像. a-d : LM 像. **a)** 全体の縦断像. 粘膜 (Mucosa: Mu), 粘膜下組織 (Submucosa: Sb), 筋層, 及び漿膜が観察された. 筋層は内縦走層 (Inner Longitudinal Muscle layer: ILM) 及び外輪走層 (Outer Circular Muscle layer: OCM) で構成されていた. HE 染色. スケールバー=200  $\mu\text{m}$ . **b)** 粘膜の横断面. 粘膜上皮は重層細胞と多量の囊状粘液細胞 (矢頭) で構成されていた. HE 染色. スケールバー=50  $\mu\text{m}$ . **c)** 内縦走筋層の縦断面. 横紋構造が認められた. HE 染色. スケールバー=50  $\mu\text{m}$ . **d)** 外輪走筋層の縦断面. 横紋構造が観察された. HE 染色. スケールバー=50  $\mu\text{m}$ . **e)** SEM 像. 上皮細胞頂部 (Apical surface: A) は指紋状の微小隆起を有しており, 囊状粘液細胞及び粘液 (矢印) が上皮細胞間に観察された. スケールバー=5  $\mu\text{m}$ .



**Figure 12.** 食道-胃噴門部, 胃噴門部, 胃体部及び胃末端部の LM 像. HE 染色. **a)** 食道-胃噴門部の縦断像. 粘膜, 粘膜下組織 (Submucosa: Sb), 筋層及び漿膜が観察された. 粘膜上皮は重層細胞及び嚢状粘液細胞 (矢頭) から単層円柱状細胞へ移行した. 領域移行直下の筋層では, 内縦走横紋筋層 (Inner Longitudinal Muscle layer: ILM) は連続していたが, 外輪走横紋筋層 (Outer Circular Muscle layer: OCM) は消失し, 中輪走平滑筋層 (Middle Circular Muscle layer: MCM) に置換した. スケールバー=200  $\mu\text{m}$ . **b)** 胃噴門部の筋層の縦断面. 内縦走横紋筋層 (Inner Longitudinal Muscle layer: ILM), 中輪走平滑筋層 (Middle Circular Muscle layer: MCM) 及び外縦走平滑筋層 (Outer Longitudinal Muscle layer: OLM) が認められた. HE 染色. スケールバー=50  $\mu\text{m}$ . **c)** 胃体部の縦断像. 粘膜, 粘膜下組織 (Submucosa: Sb), 筋層及び漿膜が観察された. 粘膜上皮は単層円柱状細胞で構成されており, 胃腺 (Gastric Glands: GG) が粘膜固有層に認められた. 筋層には内縦走層 (Inner Longitudinal Muscle layer: ILM), 中輪走層 (Middle Circular Muscle layer: MCM), 及び外縦走層 (Outer Longitudinal Muscle layer: OLM) が認められた. HE 染色. スケールバー=200  $\mu\text{m}$ . **d)** 胃体部内縦走筋層の縦断面. 横紋構造が認められた. HE 染色. スケールバー=50  $\mu\text{m}$ . **e)** 胃体部の内輪走筋層 (Middle Circular Muscle layer: MCM) 及び外縦走筋層 (Outer Longitudinal Muscle layer: OLM) の縦断面. どちらの層も平滑筋で構成されていた. HE 染色. スケールバー=50  $\mu\text{m}$ . **f)** 胃体部-胃末端部の粘膜の縦断面. 胃腺 (Gastric Glands: GG) は胃末端部では消失していた. HE 染色. スケールバー=50  $\mu\text{m}$ . **g)** 胃末端部の筋層の縦断面. 薄い内輪走層 (Circular Muscle layer: CM) 及び発達した外縦走層 (Longitudinal Muscle layer: LM) が認められた. 漿膜下組織 (Subserosa: Se) も発達していた. Sb : 粘膜下組織 (Submucosa). HE 染色. スケールバー=50  $\mu\text{m}$ .

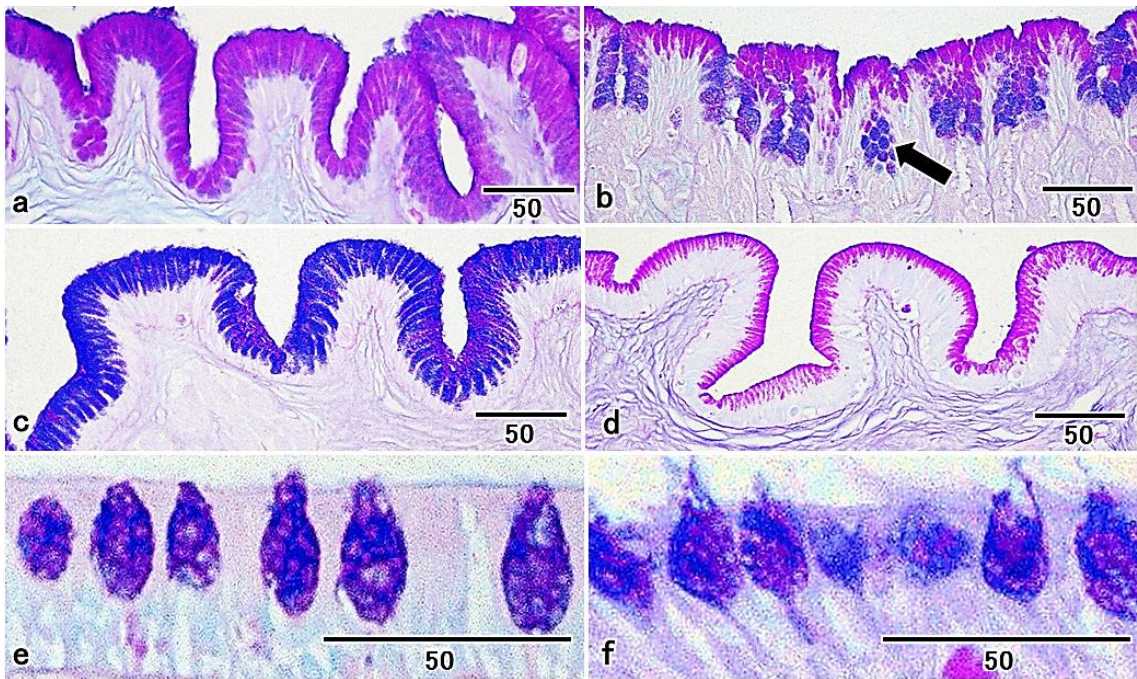


**Figure 13.** 腸前部と腸後部の LM 及び SEM 像. a-c: 腸前部. **a)** LM 像, 全体の縦断像. 粘膜 (Mucosa: Mu), 粘膜下組織 (Submucosa: Sb), 筋層 (Muscle Layer: ML) 及び漿膜が観察された. 粘膜ひだは主に二次であった. HE 染色. スケールバー=200  $\mu\text{m}$ . **b)** LM 像, 粘膜の縦断面. 単層円柱上皮細胞及び少量の杯細胞が認められた. 刷子縁 (矢頭) が観察された. HE 染色. スケールバー=50  $\mu\text{m}$ . **c)** SEM 像. 繊毛細胞が微絨毛間に認められた. スケールバー=5  $\mu\text{m}$ . d-f: 腸後部. **d)** LM 像, 全体の縦断像. 粘膜 (Mucosa: Mu), 粘膜下組織 (Submucosa: Sb), 筋層 (Muscle Layer: ML) 及び漿膜が観察された. 粘膜ひだは主に一次であった. HE 染色. スケールバー=200  $\mu\text{m}$ . **e)** LM 像. 粘膜の縦断面. 単層円柱上皮細胞及び多量の杯細胞が認められた. 刷子縁 (矢頭) が観察された. HE 染色. スケールバー=50  $\mu\text{m}$ . **f)** SEM 像. 繊毛細胞が微絨毛間に認められ, それらの密度は腸前部より高かった. スケールバー=5  $\mu\text{m}$ .





**Figure 14.** 胃及び腸における AB/PAS 染色. LM 像. **a)** 胃噴門部. 胃表層粘膜上皮細胞は赤紫色を示した. スケールバー=50  $\mu\text{m}$ . **b)** 胃体部. 胃表層粘膜上皮細胞は赤紫色を示し, 胃小窩の頸部細胞 (矢印) は青紫色を示した. スケールバー=50  $\mu\text{m}$ . **c)** 胃末端部. 胃表層粘膜上皮細胞は青紫色を示した. スケールバー=50  $\mu\text{m}$ . **d)** 胃幽門部. 胃表層粘膜上皮細胞は赤紫色を示した. スケールバー=50  $\mu\text{m}$ . **e)** 腸前部. 全ての杯細胞中の粘液は青紫色を示した. スケールバー=50  $\mu\text{m}$ . **f)** 腸後部. 全ての杯細胞中の粘液は青紫色を示した. スケールバー=50  $\mu\text{m}$ .



### 3-4 考察

マアナゴの消化管はカライワシ上目に属する他の二亜目、ウナギ亜目とウツボ亜目と共通する形質が多かった。しかしながら、これまでに報告されたウナギ目二亜目における知見と比較すると、基本構造は同じでも構築については少し異なっていた。

本種の胃は組織学的に特徴的であり、噴門部、体部、末端部及び幽門部の四領域に区分された。これは第2章で記載したアセウツボと共通する形質であった。食道の内縦走横紋筋層が胃体部にまで連続しており、その領域の筋層は三層で構成されていた。これはウナギ亜目及びウツボ亜目では筋層が二層しかないことと異なっていた。

食道において、重層細胞と豊富な囊状粘液細胞で構成される粘膜上皮、上皮細胞頂部における指紋状微小隆起及び胃と腸とは走行方向の異なる二層の横紋筋層がそれぞれ認められたが、これらはウナギ目ウナギ亜目の食道における報告と一致していた (Yamamoto and Hirano, 1978; Abaurrea-Equisoain and Ostos-Garrido, 1996)。これらの特徴は摂取した食物の運搬に適した組織構造として知られている。重層粘膜上皮細胞の頂部における微小隆起は栄養物塊による物理的損傷からの保護となり (Carrassón et al., 2006)、豊富な杯細胞由来の粘液は栄養物塊への障壁及びそれらの運搬の潤滑剤となる (Leknes, 2011)。食道壁は内縦走性及び外輪走性の二層の横紋筋層で構成されていた。この二層はウナギ亜目及びナマズ目 (Sis et al., 1979) でも報告されており、摂取した物質の吐き出しを可能にする (Cao and Wang, 2009)。注目すべき事として、食道の内縦走筋は胃体部にまで侵入していた。一方で、外輪走横紋筋層は消失し、噴門部における中輪走平滑筋層に明瞭な境界を伴って置換していた。胃体部に至る横紋筋層構造は摂取した物質の吐き出しをより容易にすると思われた。

食道における重層細胞、豊富な囊状粘液細胞及び横紋筋層といった構造は、カライワシ上目以降に分岐した硬骨魚類だけでなく、カライワシ上目以前に分岐したグループである軟骨魚綱 (Chatchavalvanich et al., 2006) や軟質亜綱 (Domeneghini et al., 1999) でも報告さ

れている。しかしながら、硬骨魚類の一部の種は摂取した栄養物の分解のために咽頭歯を有する。加えて、塩分濃度の異なる水域へ移動する種では海水への適応の間に食道の粘膜上皮に形態学的変化が起こる (Yamamoto and Hirano, 1978)。このように食道の組織形態は生理学的ならびに生態学的要因の変化に伴い変化することが知られている。食道における横紋筋層の胃体部までの進入は生理学的ならびに生態学的要因と関連する可能性が推察された。

胃は、アセウツボと同様に、胃腺を欠き発達した縦走筋層と漿膜下組織を有する胃末端部を形成していた。この領域の機能は第2章において以下のように推察された：大きな栄養物が胃体部へ運搬されてきた際に、胃末端部の縦走筋細胞はそれらを貯留するため十分に弛緩する可能性があり、一方食物が消化された後は胃幽門部へ消化物を運搬するため胃末端部の縦走筋細胞は収縮すると推察され、また胃腺の欠如はこの領域における縦走筋細胞の顕著な弛緩及び収縮という可能性と強く関連するかもしれない。

マアナゴの後方部に位置する腸は特徴的な組織構造を示し、それはウツボ亜目とウナギ亜目の中間の形態であった。隔壁様粘膜ひだはアナゴ亜目のマアナゴでは1個のみであったが、ウツボ亜目のアセウツボでは複数あり (第2章参照)、ウナギ亜目の魚種には全く存在しない (Kim et al., 2008)。腸壁における繊毛細胞もまたアセウツボと同様に認められたが、これらの密度はアセウツボと比較し低かった。第2章においてアセウツボの有する隔壁様粘膜ひだは下位真骨類以前に分岐したグループの有する腸螺旋弁と類似の働きを有する可能性を指摘し、隔壁様粘膜ひだの繊毛細胞は消化物の運搬の補助に関連していると推察した。マアナゴの繊毛細胞も同様の働きを有すると思われた。

マアナゴの消化管の主要な機能が粘液の分泌であることは興味深い。胃表層粘膜上皮細胞から分泌される粘液は、本種では中性粘液が豊富であり、アセウツボでは基本的に酸性であった。対照的に、胃末端部はアセウツボと同様に酸性粘液が優勢であり、これは他の硬骨魚類では欠けているこの領域の特殊性を組織化学的にも示していると思われた。腸は、

本種ではいずれの領域でも酸性と中性両方の粘液を分泌していた。ヨーロッパウナギ (Domeneghini et al., 2005) 及びニホンウナギ (Yamada, 1975) もまた酸性と中性両方の粘液を分泌するが、アセウツボの腸は酸性粘液のみを分泌していた (第2章参照)。故に、ウナギ目の垂目間で消化機能に差異が存在する可能性が示唆された。

消化管の粘膜上皮表面に分泌される粘液は、化学的 (Ferraris et al., 1987; Scocco et al., 1996) ならびに物理的 (Díaz et al., 2006; Manjakasy et al., 2009) 傷害からの保護、浸透圧調節 (Simonneaux et al., 1987; Díaz et al., 2008)、消化 (Anderson, 1986; Grau et al., 1992) 及び吸収 (Tibbets, 1997) に関連するとされる。粘液は含まれる糖タンパク質の種類によって酸性と中性に区分され (Neuhaus et al., 2007)、各糖タンパク質の比率は消化管の領域によって異なっている。消化管の各領域における酸性及び中性粘液の相違は内腔の化学的環境を決定し、それはすなわち各領域における化学的機能の差異を示している (Domeneghini et al., 1998)。一般に、硬骨魚類の胃は酸性を保ち表層では中性粘液を分泌し粘膜を保護している。腸では様々な消化酵素が働くために酸性と中性両方の粘液が分泌される。酸性粘液の働きについては第2章で述べた通りである。中性粘液はアルカリフォスファターゼと結合することで消化を補助し (Clarke and Witcomb, 1980)、微絨毛とともに腸細胞における吸収に関連している (Grau et al., 1992)。また中性環境の維持は特定のビタミンや消化酵素を産生する細菌に対して生態学的ニッチを形成すると考えられている (Fiertak and Kilarski, 2002)。カライワシ上目の消化管において、ウナギ垂目とアナゴ垂目が酸性と中性両方の粘液を分泌する一方で、ウツボ垂目では酸性粘液のみが分泌されることは興味深い。これらの相違の原因は食性などの生態学的要因以外の要因も、あるいは関連しているかもしれない。

マアナゴにおいてアセウツボと類似する胃末端部が認められたことは、この領域がウナギ目に特有である可能性を示しており、それはまたウナギ目における幽門垂の欠如とも関連するかもしれない。一方、ウナギ目の中でもウツボ垂目、アナゴ垂目及びウナギ垂目の間では、胃体部における横紋筋層の存在、腸の隔壁様粘膜ひだと絨毛細胞の量及び消化管

に分泌される酸性ならびに中性粘液の存在比率といった幾つかの差異が存在していた。特にマアナゴの胃体部において横紋筋層が食道から連続して走行していることは、ウナギ目の中でも特異的な組織構築であることが判明し、カライワシ上目でこのような相違が認められたことは、下位真骨類の系統発生的位置関係と消化管の多様性の関係について考察する上で興味深いと考えられた。

## 第4章

### 総括

#### —比較組織形態学から見た硬骨魚類における消化管の多様性と進化—

本論文において、カライワシ上目ウナギ目二種：アセウツボ及びマアナゴ、の消化管における組織学的ならびに組織化学的研究から明らかとなった両種の消化管の組織構築の特性とその組織構築から推察される機能をもとに、それぞれの種の特異性や系統間での共通性を見出した。更に、これら二種が属するウナギ目の消化器系臓器における形態的知見は、硬骨魚類下位真骨類の消化器系臓器の形態と系統発生的な相関の存在を補強する論拠を与え、硬骨魚類下位真骨類における内臓の多様性と進化の解析に必要な、基盤構築の必要性について論じた。

これまでウナギ目ウナギ亜目のヨーロッパウナギで見出された消化管構造の知見から、ウナギ目の盲嚢胃は噴門部、体部及び幽門部の三部から構成されることがこの目の特性とされてきた (Clarke and Witcomb, 1980)。しかしながら、本研究により同目ウツボ亜目アセウツボ及びアナゴ亜目マアナゴの盲嚢胃においては上述の三部に加え、新たに胃末端部と領域化出来る構造を発見した (第2及び3章)。両種の盲嚢胃の先端部に組織構築の異なる胃末端部が存在していることは、硬骨魚類、特に下位真骨類における胃の形態の多様性を考察する上で大変興味深い。何故なら、胃末端部の存在はウナギ目における幽門垂の欠如と関連し得ると考えられるからである。これまで無胃・有幽門垂の魚種が存在しないことなどから胃と幽門垂の間には密接な関連性があるとされている (Kapoor et al., 1975)。故に、幽門垂の付属する胃に対し、付属しない胃には独自の構造や機能が付加されている可能性が考えられた。ウナギ亜目の種において本構造が存在するか否かをより詳細に確認する必要はあるが、今回新たに発見されたこの構造はウナギ目に特有である可能性を示唆するも

のである。残念ながら、現時点においてカライワシ上目の他の目では未解明である。なお、骨鰾上目ナマズ目や棘鱗上目スズキ目ハゼ科の幽門垂の付属しない胃（これらの種は盲嚢胃ではない）においても、胃末端部のような特殊な構造が存在するかどうかを形態学的に精査することは、今後、硬骨魚類下位真骨類の消化管の多様性と進化を考察する上で極めて重要であることを指摘しておく。

比較解剖学的知見で得られたウナギ亜目間の多様性をより詳細に検討するために、アセウツボ及びマアナゴの消化管で明らかとなった組織学的ならびに組織化学的特徴を、これまでに報告されているウナギ亜目のヨーロッパウナギ及びニホンウナギの特徴を含めて比較検討した（第2及び3章）。その結果、胃体部における横紋筋層、腸の隔壁様粘膜ひだと絨毛細胞、胃表層粘膜上皮細胞中及び腸杯細胞中の酸性粘液と中性粘液の存在比率などに、亜目間で大きな違いが見られた。このようにウナギ目の消化管には全体として共通で特有の構造がある一方、各亜目間には種々の違い（多様性）があることが分かった。ウツボ亜目が海水にのみ生息しているのに対し、アナゴ亜目は海水と汽水に、ウナギ亜目は一生の間に海水、汽水及び淡水を移動して生息する。酸性粘液の分泌が優勢的であるアセウツボと中性粘液の分泌が優勢のマアナゴの消化管は、それぞれの生活環境への適応的進化であると考えられる。つまり、生息域への適応戦略の一つとして、ウナギ亜目間における消化管の多様性が生じた可能性がある。また近年、ウナギ目、特にウナギ亜目の水産資源量の急激な減少が指摘されるなか、ようやくその生活環が明らかになってきた (Tsukamoto, 2009)。今後、本研究で解明されたウナギ目二種の消化管における形態学的知見と粘液の組織化学的知見は、ウナギ目の水産利用及び水産増殖の各分野において基本データとして活用されることも期待される。

硬骨魚類下位真骨類におけるカライワシ上目の系統発生的な位置の推察を試みるにあたり、アセウツボ及びマアナゴの腸壁で見出された隔壁様粘膜ひだと絨毛細胞に着目した。両種間でひだの数に違いはあるが、特に憩室構造を形成するアセウツボの隔壁様粘膜



ひだは、軟骨魚綱や肺魚亜綱、軟質亜綱の有する螺旋弁に類似していた(第2章)。興味深いことに、両種で確認された繊毛細胞は、肺魚亜綱及び分岐鰭亜綱の腸においても確認されている。軟骨魚綱、肺魚亜綱、分岐鰭亜綱及び軟質亜綱はいずれも系統発生的に下位真骨類よりも以前に分岐したグループであることから、アセウツボ及びマアナゴの腸は、下位真骨類よりも以前に分岐したグループの腸との関連性があると推察出来る。故に、カライワシ上目が下位真骨類以前に分岐したグループの腸と類似する腸を有し、幽門垂を欠いているという結果を踏まえ、カライワシ上目は下位真骨類の系統関係においてアロワナ上目よりも先に分岐したのではないかという可能性をここに示す。カライワシ上目の分岐をアロワナ上目より前とする同様の系統仮説は、化石種と現生種における尾骨と尾椎の比較解剖学的見地からも提唱されている(Arratia, 1997)。つまり、本研究はこの系統仮説を支持する結果となった。しかしながら、更なる研究の進展により、ウナギ目の腸で確認された隔壁様粘膜ひだや繊毛細胞が、アロワナ上目やカライワシ上目のカライワシ目やソトイワシ目といった他の目に属する種の腸において発見される可能性は否定できない。またカライワシ目やソトイワシ目で幽門垂を有する種が見つかる可能性もある。この場合、カライワシ上目がアロワナ上目よりも先に分岐したのではないかという可能性は否定されることになる。上述の系統進化の問題の解決は今後の研究を待つところが大きい。これまで軟骨魚綱及び硬骨魚類の初期に発生した種のみにおいて報告されてきた螺旋弁と類似の構造が、カライワシ上目のウナギ目まで受け継がれていることが本論文において明らかになったことの意義は大きい。祖先において成立した消化器系臓器の形質(螺旋弁)が、後に分岐した下位真骨類においては同一の目に属する一部の種(アセウツボとマアナゴ)では保存されている一方で、この形質が失われている種(ヨーロッパウナギとニホンウナギ)も存在することを示すからである。すなわち、食性ならびに生息域などの変化に伴って、祖先形質とは異なった形質をもつ消化管構造が生まれることを示す興味深い事例と言える。また、ウナギ目種間の腸隔壁様粘膜ひだの数や繊毛細胞の数の差異も恐らくそれぞれの種の適応的進化により生じたものと考えられるが、その詳細

は今後の研究が待たれるところである。

今後、硬骨魚類、特にカライワシ上目の消化器系臓器の形態と系統発生的な相関の存在を確固たるものにするためには、入手が容易ではないカライワシ目やソトイワシ目の比較形態学的な解析が必須であり、並行して、ウナギ目においてまだ本格的な検証を行っていないウナギ亜目、ウツボ亜目の他種及びアナゴ亜目ウミヘビ科やハモ科の解析をする必要がある。また、硬骨魚類の消化器系臓器における組織構築のより詳細な多様性を追求するためには、免疫組織化学的なアプローチ；例えば平滑筋及び横紋筋アクチン抗体による食道から胃までの筋層の組織構築の解明、あるいはムチンコアタンパク質の mRNA を用いた *in situ* ハイブリダイゼーションによる消化器官それぞれの領域における粘液の特性の解明、も導入していく必要があるであろう。

最後に、分子遺伝学的解析手法により提唱されている分子系統関係と、本研究で主眼とした比較形態学的な系統関係をどのような切り口から融合的に取り扱うかは、大変難しい課題である。形態レベル及び分子レベルの双方の更なる解析の蓄積が必要であり、本研究目的の推進は、硬骨魚類のみならず脊椎動物の進化の過程において、どのように消化器系臓器の多様性 (内臓進化) が生み出されてきたかという解明につながると期待される。

## 参考文献

- Abaurrea-Equisoain MA, Ostos-Garrido MV. 1996. Cell types in the esophageal epithelium of *Anguilla anguilla* (Pisces, Teleostei). Cytochemical and ultrastructural characteristics. *Micron* **27**: 419-429.
- Abdel AM. 1975. The epithelium of the gastro-intestinal tract of *Polypterus senegalus* (Pisces: Brachiopterygii). *J Morphol* **146**: 447-456.
- 秋吉英雄, 井上明日香, 富室孝仁. 2003. 硬骨魚類における幽門垂の比較組織学的研究 幽門垂の解剖学および組織学的構築と系統発生学的相関. 島根大学生物資源科学部研究報告 **8**: 1-9.
- Albrecht MP, Ferreira MFN, Caramaschi EP. 2001. Anatomical features and histology of the digestive tract of two related neotropical omnivorous fishes (Characiformes; Anostomidae). *J Fish Biol* **58**: 419-430.
- Al-Mahrouki AA, Youson JH. 1998. Immunohistochemical studies of the endocrine cells within the gastro-entero-pancreatic system of Osteoglossomorpha, an ancient teleostean group. *Gen Comp Endocrinol* **110**:125-139.
- Anderson TA. 1986. Histological and cytological structure of the gastrointestinal tract of the luderick, *Girella tricuspidata* (Pisces, Kyphosidae), in relation to diet. *J Morphol* **190**: 109-119.
- Arratia G. 1997. Basal teleosts and teleostean phylogeny. *Palaeo Ichthyologica* **7**: 5-168.
- Bakke AM, Glover C, Kroghdahl Å. 2010. Feeding, digestion and absorption of nutrients. In: Grosell M, Farrell AP, Braunaer CJ, editors. *Fish physiology: The multifunctional gut of fish*. p57-75. Academic Press, Waltham.

- Buddington RK, Diamond JM. 1986. Aristotle revisited: the function of pyloric caeca in fish. Proc Natl Acad Sci U S A **83**: 8012-8014.
- Burkhardt-Holm P, Holmgren S. 1992. A study of the alimentary canal of the brachyopterygian fish *Polypterus senegalus* with electron microscopy and immunohistochemistry. Acta Zool **73**: 85-94.
- Caceci T, El-Habback HA, Smith SA, Smith BJ. 1997. The stomach of *Oreochromis niloticus* has three regions. J Fish Biol **50**: 939-952.
- Cao XJ, Wang WM. 2009. Histology and mucin histochemistry of the digestive tract of yellow catfish, *Pelteobagrus fulvidraco*. Anat Histol Embryol **38**: 254-261.
- Carrassón M, Grau A, Dopazo LR, Crespo S. 2006. A histological, histochemical and ultrastructural study of the digestive tract of *Dentex dentex* (Pisces, Sparidae). Histol Histopathol **21**: 579-593.
- Chatchavalvanich K, Marcos R, Poonpirom J, Thongpan A, Rocha E. 2006. Histology of the digestive tract of the freshwater stingray *Himantura signifer* Compagno and Roberts, 1982 (Elasmobranchii, Dasyatidae). Anat Embryol (Berl) **211**:507-518.
- Chen BN, Qin JG, Kumar MS, Hutchinson W, Clarke S. 2006. Ontogenetic development of the digestive system in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* larvae. Aquaculture **256**: 489-501.
- Clarke AJ, Witcomb DM. 1980. A study of the histology and morphology of the digestive tract of the common eel (*Anguilla anguilla*). J Fish Biol **16**: 159-170.
- Dean HW, Padykula HA. 1966. Alimentary Tract. In: Greep RO, editor. Histology. 2nd ed. p489-530. McGraw-Hill Book Company, New York.
- Díaz AO, Escalante AH, García AM, Goldemberg AL. 2006. Histology and histochemistry of the pharyngeal cavity and oesophagus of the silverside *Odontesthes bonariensis* (Cuvier and Valenciennes). Anat Histol Embryol **35**: 42-46.
- Díaz AO, García AM, Goldemberg AL. 2008. Glycoconjugates in the mucosa of the digestive tract of *Cynoscion guatucupa*: a histochemical study. Acta Histochem **110**: 76-85.

- Domeneghini C, Ponnelli Straini R, Veggetti A. 1998. Gut glycoconjugates in *Sparus aurata* L. (Pisces, Teleostei). A comparative histochemical study in larval and adult ages. *Histol Histopathol* **13**: 359-372.
- Domeneghini C, Arrighi S, Radaelli G, Bosi G, Mascarello F. 1999. Morphological and histochemical peculiarities of the gut in the white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. *Eur J Histochem* **43**: 135-145.
- Domeneghini C, Arrighi S, Radaelli G, Bosi G, Veggetti A. 2005. Histochemical analysis of glycoconjugate secretion in the alimentary canal of *Anguilla anguilla* L. *Acta Histochem* **106**: 477-487.
- Ezeasor DN, Stokoe WM. 1980. Scanning electron microscopic study of the gut mucosa of the rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. *J Fish Biol* **17**: 529-539.
- Ferraris RP, Tan JD, De La Cruz MC. 1987. Development of the digestive tract of milkfish, *Chanos chanos* (Forsskal): histology and histochemistry. *Aquaculture* **61**: 241-257.
- Fiertak A, Kilarski WM. 2002. Glycoconjugates of the intestinal goblet cells of four cyprinids. *Cell Mol Life Sci* **59**: 1724-1733.
- García HMP, Lozano MT, Elbal MT, Agulleiro B. 2001. Development of the digestive tract of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Light and electron microscopic studies. *Anat Embryol* **204**: 39-57.
- Grau A, Crespo S, Sarasquete MC, De Canales MLG. 1992. The digestive tract of the amberjack *Seriola dumerili*, Risso: a light and scanning electron microscope study. *J Fish Biol* **41**: 287-303.
- Hale PA. 1965. The morphology and histology of the digestive systems of two freshwater teleosts, *Poecilia reticulata* and *Gasterosteus aculeatus*. *Proc Zool Soc Lond* **146**: 132-149.
- Hellberg H, Bjerkås I. 2000. The anatomy of the oesophagus, stomach and intestine in common wolffish (*Anarhichas lupus* L.): a basis for diagnostic work and research. *Acta Vet Scand* **41**: 283-297

- Hossain AM, Dutta HM. 1996. Phylogeny, ontogeny, structure and function of digestive tract appendages (caeca) in teleost fish. In: Munshi JSD, Dutta HM, editors. Fish Morphology Horizon of New Research. p59-76. A.A Balkema Publishers, Lisse.
- Icardo JM, Wong WP, Colvee E, Loong AM, Ip YK. 2010. The anatomy of the gastrointestinal tract of the African lungfish, *Protopterus annectens*. Anat Rec (Hoboken) **293**: 1146-1154.
- Inoue JG, Miya M, Tsukamoto K, Nishida M. 2001a. A mitogenomic perspective on the basal teleostean phylogeny: resolving higher-level relationships with longer DNA sequences. Mol Phylogenet Evol **20**: 275-285.
- Inoue JG, Miya M, Tsukamoto K, Nishida M. 2001b. Complete mitochondrial DNA sequence of *Conger myriaster* (Teleostei: Anguilliformes): novel gene order for vertebrate mitochondrial genomes and the phylogenetic implications for anguilliform families. J Mol Evol **52**: 311-320.
- Inoue JG, Miya M, Tsukamoto K, Nishida M. 2004 Mitogenomic evidence for the monophyly of elopomorph fishes (Teleostei) and the evolutionary origin of the leptocephalus larva. Mol Phylogenet Evol **32**: 274-286.
- 城泰彦, 佐々木邦夫. 2010. ウナギ目ウナギ科ウナギ属ウナギ. 新魚類解剖大図鑑. 木村清志監修. 第1版. p84-87. 緑書房, 東京.
- Kapoor BG, Smit H, Verighina IA. 1975. The alimentary canal and digestion in teleosts. Adv Mar Biol **13**: 109-239.
- Kim YK, Ideuchi H, Watanabe S, Park SI, Huh Md, Kaneko T. 2008. Rectal water absorption in seawater-adapted Japanese eel *Anguilla japonica*. Comp Biochem Physiol **151A**: 533-541.
- Kužir S, Gjurčević E, Nejedli S, Baždarić B, Kozarić Z. 2012. Morphological and histochemical study of intestine in wild and reared European eel (*Anguilla anguilla* L.). Fish Physiol Biochem **38**: 625-633.

- Lê HLV, Lecointre G, Perasso R. 1993. A 28S rRNA-based phylogeny of the gnathostomes: first Steps in the analysis of conflict and congruence with morphologically based cladograms. *Mol Phylogenet Evol* **2**: 31–51.
- Leknes IL. 2011. Histochemical studies on mucin-rich cells in the digestive tract of a teleost, the Buenos Aires tetra (*Hyphessobrycon anisitsi*). *Acta Histochem* **113**: 353-357.
- Manjakasy JM, Day RD, Kemp A, Tibbetts IR. 2009. Functional morphology of digestion in the stomachless, piscivorous needlefishes *Tylosurus gaviatoides* and *Strongylura leiura ferox* (Teleostei: Beloniformes). *J Morphol* **270**: 1155-1165.
- Morrison CM, Wright JR. 1999. A study of the histology of the digestive tract of the Nile tilapia. *J Fish Biol* **54**: 597-606.
- Nelson JS. 1994. *Fishes of the World*. 3rd ed. Wiley, New York.
- Neuhaus M, Der MN, Caspari W, Meyer M, Enss L, Steinhagen D. 2007. Biochemical and histochemical study on the intestinal mucosa of the common carp *Cyprinus carpio* L., with special consideration of mucin glycoproteins. *J Fish Biol* **70**: 1523–1534.
- Ostos-Garrido MV, González Oller C, Abaurrea Equisoain MA. 1996. Effect of diet on gastric mucosa cells in the European eel (*Anguilla anguilla* L.). Histochemical and ultrastructural study. *Micron* **27**: 25–34.
- Patterson C, Rosen DE. 1977. Review of ichthyodectiform and other Mesozoic teleost fishes, and the theory and practice of classifying fossils. *Bull Am Mus Nat Hist* **158**: 83-172.
- Pérez-Jiménez A, Cardenete G, Morales AE, Garcia AA, Abellan E, Hidalgo MC. 2009. Digestive enzymatic profile of *Dentex dentex* and response to different dietary formulations. *Comp Biochem Physiol* **154A**: 157-164.
- Purkerson ML, Jarvis JU, Luse SA, Dempsey EW. 1975. Electron microscopy of the intestine of the African lungfish, *Protopterus aethiopicus*. *Anat Rec* **182**:71-89.

- Robins CR. 1989. The phylogenetic relationships of the anguilliform fishes. In: Böhlke EB, editors. Fishes of the western North Atlantic. Part 9. Vol 1. Orders Anguilliformes and Saccopharyngiformes. p9–23. Sears Foundation for Marine Research, New Haven.
- ローマー AS, パーソنز TS. 2007. 消化器系. 脊椎動物のからだ—その比較解剖学. 平光厲司訳. 第5版. p306-325. 法政大学出版局, 東京.
- Scocco P, Ceccarelli P, Mengh G. 1996. Glycohistochemistry of the *Tilapia* spp. stomach. J Fish Biol **49**: 584–593.
- Simonneaux V, Humbert W, Kirsch R. 1987. Mucus and intestinal ion exchanges in the sea-water adapted eel, *Anguilla anguilla* L. J Comp Physiol B **157**: 295-306.
- Sis RF, Ives PJ, Jones DM, Lewis DH, Haensly WE. 1979. The microscopic anatomy of the oesophagus, stomach and intestine of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. J Fish Biol **14**: 179-186.
- Suyehiro Y. 1942. A study on the digestive system and feeding habits of fish. Jap j Zool **10**: 1-303.
- Swan CM, Lindstrom NM, Cain KD. 2008. Identification of a localized mucosal immune response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), following immunization with a protein-hapten antigen. J Fish Dis **31**:383-393.
- Tibbets IR. 1997. The distribution and function of mucous cells and their secretions in the alimentary tract of *Arrhamphus sclerolepis krefftii*. J Fish Biol **50**: 809-820.
- Tsukamoto K. 2009. Oceanic migration and spawning of anguillid eels. J Fish Biol **74**: 1833-1852.
- Yamada K. 1975. Morphochemical analysis of mucosubstances in some epithelial tissues of the eel (*Anguilla japonica*). Histochemistry **43**: 161-172.
- Yamamoto M, Hirano T. 1978. Morphological changes in the esophageal epithelium of the eel, *Anguilla japonica*, during adaptation to seawater. Cell Tissue Res **192**: 25-38.



- Wilson JM, Castro LFC. 2010. Morphological diversity of the gastrointestinal tract in fishes. In: Grosell M, Farrell AP, Braunaer CJ, editors. Fish physiology: The multifunctional gut of fish. p1-55. Academic Press, Waltham.
- Xiong DM, Xie CX, Zhang HJ, Liu HP. 2011. Digestive enzymes along digestive tract of a carnivorous fish *Glyptosternum maculatum* (Sisoridae, Siluriformes). J Anim Physiol Anim Nutr (Berl) **95**: 56-64.

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、指導教員として始終懇切丁寧な御指導を賜りました山本達之島根大学教授、秋吉英雄島根大学准教授ならびに東政明鳥取大学教授に謹んで感謝申し上げます。

また公開審査会及び博士論文の作成にあたり、審査員として様々な御指導を賜りました山中明山口大学准教授ならびに児玉有紀島根大学准教授に厚く御礼申し上げます。

更に私を支えてくれた家族、特に天国の父に心より感謝します。

また御協力頂きました研究室のこれまでの全てのメンバーに深く感謝致します。

大変お世話になりました。誠にありがとうございました。

滝上俊平

# カライワシ上目ウナギ目アセウツボとマアナゴの消化管における光学及び走査型電子顕微鏡による比較組織学的研究

## 摘要

カライワシ上目ウナギ目ウツボ亜目ウツボ科アセウツボ *Gymnothorax pictus* (*G. pictus*) 及びアナゴ亜目アナゴ科マアナゴ *Conger myriaster* (*C. myriaster*) の消化管を光学及び走査型電子顕微鏡を用いて観察し、解剖学的・組織学的・組織化学的特徴を明らかにすると共に機能を推察した。更にそれらの特徴を系統発生的観点から比較・評価し、カライワシ上目ウナギ目の消化管の多様性について考察した。

消化管は2種いずれも食道, 長い盲嚢状の胃, 及び短い直線状の腸から構成されており, 胃幽門部に盲嚢は認められなかった。

食道の筋層は内縦走性と外輪走性の二層から構成されており, これらの層にはいずれも横紋構造が観察された。

胃は食道に続く噴門部, 盲嚢を形成する体部及び末端部, 及び腸へ続く幽門部の四領域に区分された。*C. myriaster* では, 食道の内縦走横紋筋層は胃体部まで延長していた。一方, 外輪走横紋筋層は食道において途絶しており, 胃噴門部における中輪走平滑筋層の境界と一致していた。このため *C. myriaster* の胃噴門部及び体部の筋層は, 内縦走横紋筋層, 中輪走平滑筋層, 及び外縦走平滑筋層の三層から構成されていた。胃体部の内縦走横紋筋層は疎らで, 盲嚢の先端に進行するに連れて消失した。胃末端部は胃盲嚢の尾部側の先端に位置しており, 胃体部に比べ, 解剖学的には白色調を呈し, 組織学的には胃腺及び微絨毛を欠くことと厚い縦走筋及び漿膜下組織を有することにより特徴づけられた。

腸では後部壁に隔壁様の粘膜ひだが認められた。隔壁様粘膜ひだは *G. pictus* では複数認められたが, *C. myriaster* では 1 本のみであった。腸壁にはまた絨毛細胞由来の絨毛房が

SEM 像で観察された。絨毛細胞の密度は腸後部の方が腸前部よりも高く、またそれは *G. pictus* では腸前部・後部共に *C. myriaster* より高かった。

消化管内腔に分泌される粘液の化学的性質は、*G. pictus* では主に酸性粘液が胃から腸にかけて認められたが、*C. myriaster* では酸性と中性両方の混合粘液が分泌されていた。

縦走筋細胞の収縮は消化管長の短縮をもたらす。そのため、胃末端部は縦走筋細胞を十分に弛緩/収縮させることによって、丸ごとの魚といった大きな食物を胃に貯留させ、消化後は消化物を胃幽門部へ運搬することを可能とすると推察された。胃末端部における胃腺の欠如は、この領域における縦走筋細胞の顕著な弛緩/収縮という可能性と強く関連するかもしれない。

腸後部における隔壁様の粘膜ひだは、複数の憩室を形成するという点で軟骨魚綱が有する螺旋弁に類似しており、それは吸収能を上昇させるとされている。腸壁の絨毛細胞は肺魚亜綱や軟質魚綱も有しており、腸内の物質の運搬を補助している。故に隔壁様粘膜ひだ及び絨毛細胞はいずれも腸における消化及び吸収活動を補助する構造であると推察された。

消化管内腔に分泌される粘液は粘膜上皮の化学的・物理的保護を担うだけでなく、消化及び吸収とも関連している。*G. pictus* 及び *C. myriaster* の間の粘液の化学的性質の違いは両者の消化・吸収機能に差異が存在する可能性を示唆しており、特に、*G. pictus* の消化管で顕著であった酸性粘液は、酸性環境を形成することによって酸性プロテアーゼの活性を促進させているかもしれない。

胃末端部は2種共に認められたことから、ウナギ目特有の構造である可能性が示唆された。胃末端部の存在はまた、幽門垂の欠如とも関連するかもしれない。カライワシ上目の系統発生的位置と消化管における特徴の相関を考える上で、*G. pictus* 及び *C. myriaster* が幽門垂を欠いていることと、下位真骨類より以前に分岐した軟骨魚綱や肺魚亜綱といったグループと類似する腸を有することは大変興味深いことであり、それは骨格の比較解剖に基づいてカライワシ上目はアロワナ上目よりも先に分岐したとする *Arratia* の系統仮説

(1997) を支持する可能性が示唆された。

一方, *C. myriaster* における胃体部内の横紋筋はウナギ目の中でもこれまで報告例が無く, 特有の構造であった。加えて, 隔壁様粘膜ひだや腸壁における繊毛細胞はいずれもウナギ亜目では報告されていない。 *G. pictus*, *C. myriaster*, 及びウナギ亜目の間のこの様な形態学的・組織化学的特徴の違いは, 系統発生的位置に起因する形態学的な差異がカライワシ上目の目の間においても存在する可能性を示唆した。

本研究における発見及び示唆は, 今後のウナギ目の消化器系臓器に関する種々の研究に対する基礎的な知見としてもまた有用であると思われる。

# **Comparative histological study of the digestive tracts in *Gymnothorax pictus* and *Conger myriaster* (Elopomorpha; Anguilliformes) by light and scanning electron microscopy**

## **Abstract**

The digestive tract of peppered moray eel, *Gymnothorax pictus* (*G. pictus*) and Whitespotted conger, *Conger myriaster* (*C. myriaster*) (Elopomorpha; Anguilliformes) was examined using light and scanning electron microscopy to reveal histological and histochemical features and to infer their function. Furthermore we examined and compared the features within a phylogenetic context, and discussed the diversity of the digestive tract in Elopomorpha Anguilliformes.

The digestive tract of two species was composed of the esophagus, the long blind sac stomach, and the almost straight short intestine; pyloric caeca were absent.

The muscularis of esophagus was two layers; the inner longitudinal and the outer circular, both layers was composed of striated muscle.

The stomach was divided into four regions: the cardiac region continuous with the esophagus, the long saccular body with a terminal region, and the pyloric region continuous with the intestine. In *C. myriaster*, the inner longitudinal striated muscle layer was extended to the body region of the stomach. On the other hand, the outer circular striated muscle layer was terminated in the esophagus, and became coincident to the boundary of the middle circular smooth muscle layer in the cardiac region of the stomach. Namely the muscularis of the cardiac and the body region of the stomach in *C. myriaster* were composed of three layers; an inner longitudinal striated muscle, a middle circular smooth muscle, and an outer longitudinal smooth muscle. The inner longitudinal striated muscle within the body region of the stomach was gradually disappeared as progresses to the tip of stomach

blind sac. The terminal region of the stomach was located at the tip of stomach blind sac. Compared with the body region of the stomach, the color of the terminal region of the stomach was whitish, and was histologically characterized by the absence of the gastric glands and microvilli, and also possessed the thick longitudinal muscularis and subserosa.

In intestine, the partition-like mucosal fold within the posterior region was observed. The partition-like mucosal fold was several in *G. pictus*, but that was only one in *C. myriaster*. Ciliary tufts from ciliated cells were observed on the intestinal wall. The density of the ciliated cells was markedly higher within the posterior intestine than within the anterior intestine, and was higher in *G. pictus* than in *C. myriaster*.

About the chemical nature of mucus that secreted to the lumen of the digestive tract, acidic mucus was abundant in the stomach and the intestine in *G. pictus*, but *C. myriaster* secreted the mixture of acidic and neutral mucus throughout the digestive tract.

The contractions of longitudinal muscle cells shorten the length of the digestive tract. Therefore, when large food items, such as whole fish, entering the body region of the stomach, the longitudinal muscle cells in the terminal region of the stomach might relax in order to accommodate the food item, and after the food has been sufficiently digested in the stomach, which would then contract to transport the digesta to the pyloric region. The lack of gastric glands in the terminal region may be related to the need for significant relaxation and contraction of longitudinal muscle cells in this stomach region.

The partition-like mucosal folds within the posterior intestine formed numerous diverticula, which are similar to the spiral valve. The spiral valve was possessed in Elasmobranchii and that increases digestion efficiency by increasing the absorptive area of the lumen. Ciliated cells in intestinal wall have also been reported in Dipnoi and Cladistia, they are responsible for transporting material. Thus, it is possible that the partition-like mucosal folds and ciliated cells assisted digestion

and absorption in intestine.

Mucus secreted into the mucosal epithelial surface plays an important role in protecting the digestive tract against chemical and mechanical damage, and it is also involved in digestion and absorption. The differences of chemical nature of mucus between *G. pictus* and *C. myriaster* suggested that differences in digestive and absorptive function may exist among two species. Especially abundant acidic mucus in the *G. pictus*'s digestive tract may contribute to the formation of an acidic environment on the luminal surface and that might promote the activity of acidic protease.

The finding of the terminal region of the stomach in *G. pictus* and *C. myriaster* suggests that this region is characteristic of Anguilliformes. In addition, this terminal region may also be related to the absence of the pyloric caeca in the Anguilliformes. In the digestive tract in *G. pictus* and *C. myriaster*, the absence of pyloric caeca and the presence of intestine resembling that of the group such Elasmobranchii and Dipnoi that branched off earlier than the basal teleosts, appears to support Arratia's hypothesis (1997) that, among the basal teleosts, Elopomorpha branched off before Osteoglossomorpha.

On the other hand, the striated muscle layer within the body region of the stomach in *C. myriaster* was unique structure that has not been reported among the Anguilliformes. In addition, both the partition-like mucosal fold and the ciliated cells within intestinal wall have not been reported in Anguillidae. The histological and histochemical differences among *G. pictus*, *C. myriaster*, and Anguillidae suggested the possible existence of morphological differences that originate from phylogenetic position among the orders in Elopomorpha.

The findings of this study provide foundation for future investigations on the digestive tract of Elopomorpha Anguilliformes.



## 学会誌公表論文リスト

1. Takiue S, Akiyoshi H. 2013. Light and scanning electron microscope examination of the digestive tract in peppered moray eel, *Gymnothorax pictus* (Elopomorpha). *Anat Rec* 296: 443-451.

———第2章

2. Takiue S, Akiyoshi H. 2014. Histological and scanning electron microscopic examination of the digestive tract in whitespotted conger, *Conger myriaster* (Anguilliformes). *J Phylogen Evolution Biol* 2: 125.

———第3章