論文

野生メダカに見出された嚢胞に関する病理組織学的所見

西槇俊之¹・勝村啓史¹・尾田正二^{2*}・小賀厚徳³・小川元之¹・太田博樹¹

(2015年6月19日受付)

Histopathological Features of Cysts in Wild Medaka Fish

Toshiyuki Nishimaki¹, Takafumi Katsumura¹, Shoji Oda^{2*}, Atsunori Oga³,
Motoyuki Ogawa¹ and Hiroki Oota¹

¹Department of Anatomy, Kitasato University School of Medicine, Kanagawa 252-0374, Japan

²Department of Integrated Biosciences, Graduate School of Frontier Sciences,
The University of Tokyo, Chiba 277-8562, Japan

³Department of Pathology, Yamaguchi University Graduate School of Medicine,
Yamaguchi 755-8505, Japan

(Received June 19, 2015)

ABSTRACT—Pathogenic studies using model animals for diseases that are found in similar diagnosis as in humans are widespread and medaka fish *Oryzias latipes* is one of such animal models, however, histological studies on their diseases are still limited. In this study, we applied whole body serial tissue sectioning to adult medaka; it is similar to whole body computed tomography (CT) scanning to decide the lesion (s) location, furthermore, it can give us more precisely microscopic histological information. When adult medaka collected from a wild population were examined, we found cystic lesion (s) in their testis with a diameter of about 500 μ m, filled with serous material. Because each of cysts was covered with epithelium, the lesion was found to be a true cyst. Cysts with the same histological appearance were also found adjacent to ovary and liver, and some of the medaka showed polycystic condition. This condition was seen at a high frequency in wild medaka, but it had not been found in laboratory-reared medaka. Although number of observations is small for giving conclusion, these results suggest that cysts could be a common lesion in wild medaka and whole body sectioning can be a powerful methodology for pathological examination of model animal like medaka.

Key words: Cyst, medaka, whole body serial tissue section, polycystic kidney disease

Cyst (嚢胞) は病理学的に上皮で内面をおおわれた袋状のものを指し、経過によって内面の上皮が不明になることもあり、腫瘍性の場合もある。通常、その内腔は液体または半固体状の物質で満たされ、単房性または多房性で閉ざされる。精巣における嚢胞は、古くはヒトでは稀な疾患とされていたが超音波診断等の診断法の発達と普及とともに初期病変の診断が容易となり、現在で

は比較的高い頻度で観察される疾患である (Gooding et al., 1987; 増田ら, 1993)。ヒト以外の生物においても嚢胞が生じていると考えられ、その形成原因等を究明することはヒトの嚢胞の発生メカニズムを明らかにする手がかりを与えるものと期待できるが、一部のモデル生物を除いて嚢胞に関する知見はほとんど無いのが現状である。

本稿では、生物学および医学の分野でモデル生物として多用されるメダカ *Oryzias latipes* において、嚢胞の有無を探索した。メダカの体躯が小さい (体長約 3 cm) ことを活かしてメダカの全身より矢状面によるパラフィン連続組織切片を作製し、メダカの全身組織において病理組織学的な検討を行い、精巣および卵巣に単房性および

¹ 北里大学医学部解剖学

² 東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻

³ 山口大学大学院医学系研究科分子病理・第二病理学

* Corresponding author

E-mail: odasho@k.u-tokyo.ac.jp

多房性の嚢胞様組織異常を見出したので、ここに報告する。

材料および方法

供試魚

石川県で採取した野生メダカ（体長 2.5 cm 前後）の成魚を雌雄各 4 匹ずつ使用した。メダカは北里大学医学部動物実験取扱規定に従って、苦痛を与えずに安楽死させた。

連続全身組織切片の作製および病理組織学的観察

外観における異常の有無を観察した上で、安楽死させたメダカを Davidson 氏固定液に浸し、室温で 10 日間固定した。固定後、定法にならってパラフィン包埋し、滑走式ミクロトーム（リトトーム REM700, 大和光機工業株式会社）を使用して厚さ 5 μm の矢状面および横断面によるパラフィン連続全身組織切片を作製した（尾田ら, 2014）。作製した全身組織切片を脱パラフィン・脱アルコール・水洗した後に、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色もしくはアルシアンブルーPAS 染色を施し、光学顕微鏡下にて鏡検した。

結 果

精巣嚢胞

外見上、野生雄メダカには特に異常等は認められなかった。雄のメダカ成魚のパラフィン全身組織切片にお

いて探索した結果、本研究において検討を行った野生メダカ雄成魚 4 匹のうち 3 匹において通常の精巣では認められない 1～4 個の嚢胞様の組織異常を精巣近傍に認めた（Fig. 1A；矢状面切片）。メダカの精巣では周辺部に精原細胞を含む精巣小葉が位置し、一つの精巣小葉に内含される精原細胞がクローナルに増殖し精子形成を進めるにつれて、精巣深部に位置するようになる（Fig. 1B；横断面切片）。完成した精子は細精管に続く輸精小管内を精巣深部へ移送され、精巣後半部の背部中央に位置する輸出管に集合・貯留される（濱口, 1990）。嚢胞様構造は直径が約 500 μm であり、その内部は HE 染色において染色されない均質な成分で満たされていたことから、哺乳類における嚢胞と同様の組織構造異常であるものと考えられたが、嚢胞によっては内部中心付近に細胞塊らしき構造を有する場合も認められた（Fig. 1C）。矢状面切片において観察された嚢胞様構造はほとんどの場合精巣後半部位の背側に位置したが、正常な精巣組織構造の内部に嚢胞が形成される像も観察された（Fig. 1D）。精巣近傍に生じた嚢胞が精巣内部の構造に由来することは、Fig. 2 に示される組織像によっても明瞭に確認された。すなわち、嚢胞は重層扁平上皮様の薄い角質化した細胞層によって覆われるが、その細胞層を覆う結合組織様細胞層は精巣内部の細精管・輸精小管の壁を構成する細胞層と連続していた（Fig. 2B）。さらに Fig. 2A に示される嚢胞では内部の細胞塊が精子に由来するものと考えられることから（Fig. 2C）、今回の野生メダカ精巣に見出さ

Fig. 1. Paraffin-embedded whole tissue section of a wild adult male (A). Arrowheads in A indicate the cysts in the testis. In the normal testis (B), spermatogonia (SG) locate peripherally and matured sperm (small grains stained deeply in B, C, D are nuclei of matured sperm; Sp) are transferred through seminiferous tubule (ST) in the deeper part of testis. C show the magnified images of sections of the testis with cysts shown in A. In sections from another male, cysts located inside of the testis (D) surrounded by proliferating spermatogonia. Bars represent 2 mm, 100 μm , 200 μm , and 200 μm in A, B, C and D, respectively. SB: swim bladder, Liv: liver, Tes: testis, Int: intestine, Her: heart, Mus: muscle, Bra: brain.

Fig. 2. Some of the cysts in the testis contained cell mass in its central part and/or the peripheral part. B shows a higher magnified image of the white boxed region in A, representing that the squamous epithelium of the cyst originated from the tissue of the testis. C shows a higher magnified image of the black boxed region in A, with mass of cells with very small nucleus, presumably degenerating spermatozoa. Bars represent 200 μm , 50 μm and 50 μm in A, B, and C, respectively. Tes: testis.

Fig. 3. Cross sections of the testicular cysts in wild adult males are presented. The contents of the testicular cyst were stained in violet deeply by Alcian Blue - PAS staining (A, B) in the same way as the cysts in ovary (Fig. 7). In the cysts shown in A and B, rete-like structures (white arrowheads) are present in the peripheral regions, which are likely degenerating seminal ducts in the testis, strongly suggesting that the testicular cysts are originated not in gametes, but the testicular structure. Squamous epithelium (arrow) of the cyst shown in C is continuous with the tubular wall of the seminal ducts in testis. Some testicular cysts contained numerous spermatozoa inside (D). These findings strongly support the idea that the testicular cysts are originated in the testicular structure, presumably seminal ducts in testis. Bars represent 200 μm in A, B and 100 μm in C, D.

Fig. 4. Three serial sections of a cyst in a wild adult male are presented (A–C). Arrowheads in A and B represent that cells outside of the testis were included into the cyst, which can be the origin of the cell mass in the central part of some cysts (C). Bars represent 200 μ m. Int: intestine.

れた嚢胞は、精巣内部の輸精小管の一部が肥大・膨潤化したものと考えられる。

組織切片をアルシアンブルー-PAS 染色したところ、嚢胞の内容物が紫色に濃染されたことから、嚢胞が漿液性の内容物で満たされていることが強く示唆された (Fig. 3A, B)。Fig. 3A, B に示す精巣嚢胞では、嚢胞を覆う上皮様組織の一部が網目状の構造をみせること、嚢胞を覆う上皮様組織が細精管もしくは輸精小管の隔壁を成す細胞組織と連続していること (Fig. 3C)、そして内腔に大量の精子を貯留する嚢胞が存在したこと (Fig. 3D) から、これら精巣嚢胞が細精管もしくは輸精小管に由来する可能性が強く支持された。一方、Fig. 4 に連続切片像

Fig. 5. In some of the fish examined, cysts developed adjacent to liver, of which structure was almost the same as the cysts in the testis (A), covered with squamous epithelium-like structure (white arrowhead) that is closely resemble to that observed in testicular and ovarian cysts (Fig. 2, 3, 6, 7). The cyst shown in A contained irregular structures stained in deep violet by HE (black arrowheads), of which origin is unknown. It was clear that the cyst shown in A is not gall bladder, because the gall bladder was present in the more dorsal part of the abdomen of this fish. Tubules in the kidney of some of the fish swelled extensively, showing the histological appearance characteristic to the model fish of polycystic kidney disease (B, C). The parenthesized image in C represents the normal tubule of a healthy fish in the same scale. Asterisks in C indicate the swollen tubules, while a Bowman's capsule (BC) appears intact. Bars represent 200 μ m, 500 μ m and 50 μ m in A, B and C, respectively. Liv: liver, Kid: kidney, Int: intestine, Thy: thyroid.

を示す嚢胞では、嚢胞の外部に位置する細胞組織が嚢胞の内腔に陥入して嚢胞内腔の細胞塊と連絡しており、

Fig. 2, 3 に示した嚢胞とはその起源と形成過程を異にするものと考えられる。

さらにこれらの個体では、肝臓や腎臓などの他の臓器にも嚢胞が認められた。腹腔内の肝臓尾部側に、精巣に認められたものとはほぼ同じ構造の嚢胞が認められた例を Fig. 5A に示す。また、別の精巣嚢胞を有した個体では著しく膨潤化した尿細管によって腎臓が大きく肥大化しており (Fig. 5B, C), ヒトにおける嚢胞腎症との症状の類似性が認められた。

卵巣嚢胞

野生雌メダカの外見上にも特に異常等は認められなかったが、麻酔した雌成魚から摘出した卵巣の表面に2個の嚢胞様組織構造を認めた (Fig. 6A)。肉眼による観察では、卵巣内部より突出しているのではなく卵巣の表面の一部が嚢胞化しており、その内腔は液体あるいは半固体状の内容物で満たされている様に観察された。摘出した卵巣の組織切片を HE 染色して検鏡したところ、嚢胞はエオジンにより赤色に濃染される重層扁平上皮と考えられる薄い角質化した細胞層でおおわれており、内腔中心部に細胞塊が認められた。当該の嚢胞と卵巣の内部組

Fig. 6. (A) Two cyst-like structures located on the isolated ovary from a wild female adult medaka (white arrows). The ovary was chemically fixed, sectioned, and HE stained. Cyst (black arrow heads in B) were clearly distinctive from oocytes, since they were much larger than maturing oocytes and surrounded with thin squamous epithelium (arrow head in C). Both cysts contained cell mass in its central part (arrow in C). In B, a large cell mass labeled "Tum" was an abnormal structure of the ovary, presumably tumor. Bars represent 1 mm, 300 μ m, and 50 μ m in A, B, and C, respectively. Ov: ovary.

Fig. 7. Paraffin-embedded whole tissue section of wild female (A) and 4 cysts associated with the ovary (arrowheads). B shows the magnified image of the ovary with the cysts in A. C represents a magnified image of a cyst adjacent to the ovary. The contents of the cyst was stained in deep violet with Alcian Blue -PAS Staining, suggesting that the cyst was filled with serous material. The connective tissues surrounding the cyst and ovary fused, suggesting that the origin of the cysts can be tissues associated with ovary, but not oocytes nor other somatic cells in ovary. Bars represent 2 mm, 500 μ m, and 50 μ m in A, B, and C, respectively. SB: swim bladder, Liv: liver, Ov: ovary, Her: heart, Mus: muscle, Int: intestine.

嚢胞との連絡は認められず、組織学的形態から嚢胞は卵細胞に由来するものでもないと判断した (Fig. 6B, C)。

また、野生メダカ雌成魚における嚢胞様組織構造の分布とそれらの詳細な構造および周辺の組織構造を観察するために、パラフィン連続全身組織切片を作製して鏡検したところ、腹腔内において卵巣に密接して複数の嚢胞が密集する多嚢胞性の組織異常が見出された。卵巣の部分は正常な組織像を呈していた (Fig. 7A, B)。別の雌メダカ成体の腹部クロス切片ではアルシアンブルー染色により濃染される内容物を有する2個の嚢胞が見出されたが、その片方の嚢胞を覆う結合組織様構造が卵巣を覆う卵巣壁組織と連続していた (Fig. 7C)。メダカの卵巣は、様々な発育段階の多数の卵母細胞が卵巣壁に包みこまれる構造として腹腔内に認識される (Iwamatsu, 1988; 濱口, 1990; 岩松, 1997)。当該の嚢胞は卵母細胞あるいは卵巣内部の組織構造とは明らかに独立しており、卵巣に接しているものの卵巣の内部構造には由来しないものと考えられた。野生メダカ雌成魚において見出された卵巣近傍における嚢胞の形状と構造は雄成魚において見出された精巣嚢胞とほぼ同一であり、嚢胞の大きさはいずれも直径が0.5~1 mmであって球体状を呈していた。また、これら見出されたすべての嚢胞を内装する上皮に腫瘍性異型は認めなかった。

考 察

本研究では、メダカ成魚の全身組織連続切片を作製して全組織において病理組織学的に嚢胞の有無を検証した結果、精巣、卵巣および肝臓等に単房性および多房性の嚢胞を見出した。これらの嚢胞は形状や大きさ、内部構造が単純でほぼ同一であったことから、ヒト等哺乳類において嚢胞と呼ばれる組織異常に相当するものと判断した。寄生虫や奇形腫（テラトーマ）の可能性を考慮し、全身組織連続切片であることを活かして嚢胞様組織異常の構造全体を検討した結果、細胞器官を思わせるような組織だった細胞構造や腫瘍性の異型は全く認められなかった。ヒトや他の哺乳類においての病理学的定義では、嚢胞は上皮で内面をおおわれた袋状のものを指し、経過によって内面の上皮が不明になることもあるとされる。ヒトでは、嚢胞を多発する遺伝性疾患が知られており、常染色体優性遺伝性多発性嚢胞腎症では多発腎嚢胞のほか、頭蓋内（脳硬膜）、肝臓、脾臓、睪丸、卵巣などにも嚢胞を生じることが知られている。さらにヒトの精巣では、水腫や炎症で急速に嚢胞が増大する場合、不妊治療に関わる場合、あるいは腫瘍化する場合に臨床的に取り扱われることが多いが、精巣の検査は一般的ではないことから自覚症状が無いものや小さいものは実際上無視され、古くは精巣嚢胞の頻度は稀とされていた。Gooding *et al.* (1987) は307人の男性を対象として無作為に陰嚢

超音波検査を実施し、30人（9.8%）の精巣に嚢胞が見出されたことを報告し、超音波診断などの手法の発達により診断例数は増加の傾向にある。今回メダカ成体において見出された嚢胞は精巣の内部組織に由来する構造異常と考えられる。特に Fig. 2 および Fig. 3 に示される例では嚢胞内腔に多数の精子細胞が存在し、あるいは内腔が多量の精子で満たされ嚢胞の上皮様組織が細精管もしくは輸精小管の隔壁組織に連続していたことから、精巣嚢胞が輸精小管の一部の局所的な膨大化に由来する可能性が考えられ、本報告におけるメダカの精巣嚢胞はヒトにおける精巣上体嚢胞と相同のものである可能性がある。精巣嚢胞の大半が精巣の尾部側・背側の、輸精小管が合流した輸出管部と同じ位置に頻繁に見出されたことも、精巣嚢胞の原因を輸精小管の膨大化と考えることに矛盾しない。しかし、Fig. 4 にその連続切片を示した嚢胞では嚢胞外部に位置する細胞塊が嚢胞内腔に陥入して嚢胞の内腔中心部の細胞塊と連絡しており、輸精管の膨大化に由来するとは考えられず、メダカ精巣嚢胞の由来が単一ではない可能性を示している。

精巣嚢胞を有していた雄成魚において、尿細管が膨潤化し重篤な嚢胞腎の症状を呈している個体が認められ (Fig. 5B, C)、常染色体優性遺伝性多発性嚢胞腎症のモデルとして報告されている *pc* 変異体メダカにおける腎臓の組織像と極めて類似していた (Mochizuki *et al.*, 2005)。ヒト多発性嚢胞腎症においては、肝嚢胞の形成に加えて精巣嚢胞が形成される症例も知られているが、*pc* 変異体メダカでは精巣嚢胞の形成は報告されていないことから、本研究で報告するメダカの多発性嚢胞腎症様症例とは発症メカニズムが異なる可能性も考えられる。

一方、メダカの雌成体においても雄で見出された精巣嚢胞に極めて類似した構造の嚢胞が卵巣近傍に見出された。ヒトにおける卵巣嚢胞の場合には、妊娠や体調不良などでの検査によって卵巣嚢胞が発見される機会が多く、男性の場合より臨床的に検討される機会は多い。腫瘍以外に、機能性の黄体嚢胞や卵胞嚢胞のほか、単純性嚢胞とされるもの、子宮内膜症によるもの、卵巣や卵管の周辺に嚢胞を生じる傍卵管（卵巣）嚢胞が病理検査でしばしば経験される。今回メダカにおいて卵巣近傍に見出された嚢胞の構造は単純であり、魚類と哺乳類の生殖様式の違いから黄体嚢胞、卵胞嚢胞、子宮内膜症関連の組織異常と相同であるものと考え方には難があり、ヒトの知見と単純に比較検討することはできない。メダカ卵巣近傍に見出された精巣嚢胞とほぼ同じ構造を有する嚢胞の組織学的な由来に関しては不明であり、今後の課題である。哺乳類においては精巣上体・輸精管はウォルフ管をその起源とし、雌個体においては卵管等の組織構造がミュラー管に由来するのに対して、魚類においては雄において輸出管から輸精管にかかる部位はウォルフ管に

は由来せず、また雌においてもミューラー管を欠くなど、哺乳類と魚類においては生殖腺に付属する管構造の起源が全く異なることが知られている (Suzuki and Shibata, 2004)。今回、ほぼ同じ構造の嚢胞がメダカの精巣・卵巣に見出されたことは、魚類特有の発生様式に起因する可能性も考えられる。

今回調査した野生メダカにおいては8匹中6匹 (75.0%) において卵巣および精巣に単房性および多房性の嚢胞が発生していたことから、野生のメダカでは稀な病変ではない可能性も考えられる。しかし、メダカ (*Oryzias latipes*) は日本各地域で遺伝的に高度に種内分化しているため (Takehana *et al.*, 2003; Kasahara *et al.*, 2007; Katsumura *et al.* 2009)、他の野生メダカ集団が本論文で報告する石川県産のメダカと同様の発症頻度を示すかどうかは不明である。四国の一部地域で採取した野生メダカでは、6匹中に6匹 (100%) の割合で卵巣および精巣で嚢胞の発生が認められた (西横ら、未公表)。その一方で、本研究室の実験室内で管理・飼育されたメダカをこれまでに約100個体について調べたが、嚢胞の発生は今までに全く経験していない (西横ら、未発表)。実験室環境に比べ野生環境下のメダカにおいて嚢胞発生の頻度が高いという知見は、嚢胞の発生が実験室飼育環境になくて野生環境にある何らかの環境要因に起因する可能性を示唆するものとも考えられる。野生メダカにおいて精巣および卵巣嚢胞がより頻発に見出された原因とその機序については今後の検討が必要である。

メダカに限らず魚類全般にわたり精巣および卵巣嚢胞に関する報告例は極めて少ない。本研究によるメダカの精巣および卵巣嚢胞の形状や内部構造に関する病理組織学的な記載は、疾患モデル生物として用いられているメダカのみならず、他魚種における嚢胞の病理学的解明の基礎となるものと期待される。本研究において、疾患を病理学組織的に検討する場合に、全臓器の病変を網羅的に検討できる連続全身組織切片法はメダカのような小型のモデル魚類において全身組織を網羅的に探索する目的に特に有用であることが改めて示された。今後、メダカやゼブラフィッシュ等の小型のモデル魚類を対象とした連続全身組織切片法を用いることによって、他の病変についても病理組織学的研究が進むものと期待される。

文 献

- Gooding, G. A., W. Leonhardt and R. Stein (1987): Testicular cysts: US findings. *Radiology*, **163**, 537–538.
- 濱口 哲 (1990): 生殖細胞の分化, 「メダカの生物学, 江上信雄, 山上健次郎, 嶋 昭紘編」, 東京大学出版会, 東京, pp. 7–27.
- Iwamatsu, T., T. Ohta, E. Oshima and N. Sakai (1988): Oogenesis in the Medaka *Oryzias latipes* – Stages of Oocyte Development: Developmental Biology. *Zoological sci.*, **5**, 353–373.
- 岩松鷹司 (1997): メダカ学全書, 大学教育出版, 岡山, pp. 167–168.
- Kasahara, M., K. Naruse, S. Sasaki, Y. Nakatani, W. Qu, B. Ahsan, T. Yamada, Y. Nagayasu, K. Doi, Y. Kasai, T. Jindo, D. Kobayashi, A. Shimada, A. Toyoda, Y. Kuroki, A. Fujiyama, T. Sasaki, A. Shimizu, S. Asakawa, N. Shimizu, S. Hashimoto, J. Yang, Y. Lee, K. Matsushima, S. Sugano, M. Sakaizumi, T. Narita, K. Ohishi, S. Haga, F. Ohta, H. Nomoto, K. Nogata, T. Morishita, T. Endo, I. T. Shin, H. Takeda, S. Morishita and Y. Kohara (2007): The medaka draft genome and insights into vertebrate genome evolution. *Nature*, **447**, 714–719.
- Katsumura, T., S. Oda, S. Mano, N. Suguro, K. Watanabe, H. Mitani, H. Oota and S. Kawamura (2009): Genetic differentiation among local populations of medaka fish (*Oryzias latipes*) evaluated through grid- and deme-based sampling. *Gene*, **443**, 170–177.
- 増田 均・山田拓己・長浜克志・永松秀樹・根岸壮治・森本信二 (1993): 嚢胞性精巣病変の3例: 単純性精巣嚢胞, 精巣白膜嚢胞, 嚢胞性成熟奇形腫の各1例. 泌尿器科紀要, **39**, 265–268.
- Mochizuki, E., K. Fukuta, T. Tada, T. Harada, N. Watanabe, S. Matsuo, H. Hashimoto, K. Ozato and Y. Wakamatsu (2005): Fish mesonephric model of polycystic kidney disease in medaka (*Oryzias latipes*) *pc* mutant. *Kidney Int.*, **68**, 23–34.
- 尾田正二・西横俊之・勝村啓史・片田吉彦・小賀厚徳・池本健三・谷口善仁・太田博樹 (2014): 連続全身組織切片と24時間トラッキングによるメダカの組織形態と活動性の網羅的な解析. *Cytometry Research*, **24**, 9–14.
- Suzuki, A. and N. Shibata (2004): Developmental process of genital ducts in the medaka, *Oryzias latipes*. *Zoological sci.*, **21**, 397–406.
- Takehana, Y., N. Nagai, M. Matsuda, K. Tsuchiya and M. Sakaizumi (2003): Geographic variation and diversity of the cytochrome b gene in Japanese wild populations of medaka, *Oryzias latipes*. *Zoological sci.*, **20**, 1279–1291.