

学 位 論 文 題 名

サケ科魚類雌の性成熟に及ぼす甲状腺ホルモンの作用に関する研究

学位論文内容の要旨

一般に硬骨魚類の卵巣卵の発達は、生殖腺刺激ホルモン（GTH）の働きと、その刺激により合成・分泌された性ステロイドの働きにより進行するが、この過程には他の様々な内分泌要因もまた関与している。甲状腺ホルモンもその一つと考えられるが、魚類の卵巣発達と甲状腺ホルモンとの関連を示唆する報告はこれまであまりにも断片的であり、その作用機構も未だ明確ではない。本研究では、サケ科魚類の性成熟に関わる甲状腺ホルモンの働きを解明する目的で、サクラマス *Oncorhynchus masou* の卵巣発達に伴う甲状腺ホルモン（thyroxine, T_4 ; triiodothyronine, T_3 ）、estradiol- 17β (E_2), 17α , 20β -dihydroxy- 4 -pregnen- 3 -one (DHP) および vitellogenin (VTG) の血中量の変化を測定するとともに、サクラマスおよびニジマス *Oncorhynchus mykiss* の卵濾胞における甲状腺ホルモンの代謝および特異的取り込みを調べ、卵濾胞組織の甲状腺ホルモンの標的細胞としての可能性を検討した。また、サクラマスの卵濾胞における甲状腺ホルモンの特異的取り込み率の季節変化を調べ、卵巣における甲状腺ホルモンの作用時期を検討した。さらに、生体外培養法を用いて、卵濾胞におけるステロイド合成および最終成熟に及ぼす甲状腺ホルモンの影響を調べた。これらの研究に加えて、甲状腺ホルモンの卵発達に関わる諸作用が魚類一般に共通する現象であるか否かを検討するため、生殖様式の異なるメダカ *Oryzias latipes* を用いて、血中 T_4 、 T_3 および E_2 量の日周変化を測定するとともに、卵発達段階の異なる卵濾胞についてステロイド合成に及ぼす甲状腺ホルモンの影響を調べ、さらに産卵環境が卵の最終成熟を誘導するアユ *Plecoglossus altivelis* を用いて、産卵環境への移行に伴う血中 T_4 量の変化を測定するとともに最終成熟に及ぼす T_3 の影響を調べた。

サクラマスの T_4 および T_3 の血中量は、卵黄形成開始前の3月にピークを示した後、 E_2 および VTG の血中量が上昇する卵黄形成期には低値を維持し、血中 DHP 量が上昇する最終成熟期から産卵期にかけてさらに減少した。このことから、甲状腺ホルモンの血中量の上昇が卵黄形成開始期の卵巣の GTH に対する感受性を高めている可能性が示唆された。しかし、血中ホルモン量の挙動のみからその特定の作用を推定することは困難であるため、卵濾胞を用いた生体外実験

によってその検討を行った。

ニジマスの卵濾胞細胞層では、莢膜細胞層と顆粒膜細胞層のいずれにおいても T_4 から T_3 への代謝が観察された。しかし、莢膜細胞層では培養24時間後の T_3 代謝量が顆粒膜細胞層のその3.5倍と高く、 T_4 から T_3 への代謝が主に莢膜細胞層で行われることが確かめられた。また、 T_3 は莢膜細胞中よりも培養液中に多量に存在しており、細胞内に取り込まれた T_4 が直ちに T_3 に代謝されて細胞外へ放出される可能性を示した。また、サクラマスおよびニジマスの卵濾胞細胞層が甲状腺ホルモンを特異的に取り込むことが明らかにされた。この特異的取り込みは莢膜細胞層で顕著であり、顆粒膜細胞層では認められず、莢膜細胞層が T_3 の特異的取り込み機構を持ち、甲状腺ホルモンの標的細胞としての特徴を有することが初めて明らかにされた。さらに、サクラマスの卵濾胞における甲状腺ホルモンの特異的取り込み率は、血中甲状腺ホルモン量が最も高かった卵黄形成開始前の3月中旬に最高値を示した。これらのことから、甲状腺ホルモンが卵濾胞に直接作用して卵黄形成の開始に何らかの役割を担っている可能性が強く示唆された。

卵巣における甲状腺ホルモンの生理作用の一つとして、性ステロイド合成との関わりを検討した。まず、卵黄形成期のサクラマスおよびニジマスの卵濾胞に T_3 を添加して生体外培養を行ったところ、 T_3 単独では progesterone (P), testosterone (T) および E_2 の合成を高める効果は認められなかったが、サケ生殖腺刺激ホルモン (GTH) の存在下では T_3 はPおよびTの合成を促進した。さらに、卵黄形成期のニジマスの卵濾胞細胞層を莢膜細胞層と顆粒膜細胞層とに分離し、 T_3 を添加して同様の培養を行ったところ、 T_3 は莢膜細胞層のP合成のみを高めた。このことから、 T_3 は卵黄形成期には莢膜細胞層のGTHに対する感受性を高めて、Pまでのステロイド生合成を促進する可能性が示唆された。次に最終成熟期のサクラマスおよびニジマス卵濾胞を T_3 を添加して生体外で培養したところ、 T_3 単独ではDHP合成および卵核胞崩壊 (GVBD) を高める効果は認められなかったが、サケGTHの存在下では T_3 のDHP合成およびGVBDの促進効果が観察された。しかし、 T_3 のDHP合成促進効果とGVBD促進効果は必ずしも一致しなかったことから、卵濾胞における T_3 の作用については複数の機構が存在する可能性が示唆された。

サケ科魚類とは生殖様式の異なるメダカの T_4 および T_3 の血中量は E_2 のそれと同時に上昇を始め、 E_2 がピークを示す4時間前に最高値に達して、甲状腺ホルモンがメダカにおいても卵黄形成期の卵発達に作用している可能性を示した。また、甲状腺ホルモンの血中量は、卵黄形成期のみならず最終成熟期にも高値をとり、甲状腺ホルモンの最終成熟への関与を強く示した。さらに、発達段階の異なるメダカ卵濾胞に T_3 を添加して生体外で培養したところ、 T_3 は単独では

E₂合成を高めなかったが、妊馬血清性生殖腺刺激ホルモン（PMSG）の存在下で卵濾胞におけるE₂合成を促進した。このことから、甲状腺ホルモンはメダカ卵濾胞でのE₂合成に関するGTHの作用を高めることが示唆された。

一方、アユ雌の血中T₄量は産卵環境への移行後3日目に上昇したが、非産卵環境の群では全く変化を示さなかった。また、アユ雌へのT₃の投与のみでは最終成熟および産卵は誘起されなかったが、T₃処理個体の卵巣を生体外でDHPと共に培養したところ、卵母細胞のGVBDが促進される傾向が強く認められ、T₃がアユの卵母細胞に直接作用しDHPに対する反応性を高める可能性が示唆された。さらにT₃処理個体は雄の臭いに反応して高い排卵率を示し、T₃は雄性フェロモンに対する雌の感受性を高める作用を持つと推定された。

以上の結果より、本研究に用いた魚種では卵巣が甲状腺ホルモンの標的器官であり、特にサケ科魚類では莖膜細胞層がその主要な標的細胞である可能性が高いと結論された。また、卵濾胞におけるT₃の作用はGTHの作用と密接に関連していることが明らかにされた。T₃の卵濾胞におけるステロイド合成促進効果は魚類一般に共通の作用のように思われるが、魚種や卵巣卵の発達段階によりその効果に相違がみられることから、卵巣卵の発達段階や生殖様式の相違を考慮にいたれたより詳細な実験解析が必要であると考えられる。

学位論文審査の要旨

主査	教授	高橋 裕 哉
副査	教授	山崎 文 雄
副査	助教授	山内 皓 平

魚類の性成熟の進行には、脳下垂体からの生殖腺刺激ホルモン（GtH）および生殖腺からの性ホルモンが主要な役割を演ずることは周知の事実であるが、それ以外の内分泌要因も相乗的ないし許容的な作用を持つことが想定されており、それについても多様な面からの研究がなされている。申請者の研究はそれらの因子の一つとして甲状腺ホルモン（サイロキシン、T₄；トリヨードサイロニン、T₃）に着目し、その作用の場を卵巣とする作業仮説の下に、主にサケ科魚類の単回産卵型のサクラマス（*Oncorhynchus masou*）および多回産卵型のニジマス（*Oncorhynchus mykiss*）の卵濾胞における性ステロイド合成と最終成熟に及ぼす甲状腺ホルモン

の影響を明らかにしたものである。さらに本研究では排卵が光周期と同期して起こるメダカ科のメダカ (*Oryzias latipes*)、および排卵の誘起が特異的産卵環境と雄の存在に依存するアユ科のアユ (*Plecoglossus altivelis*) についても、同様な観点からの実験的研究がなされ、性成熟に関連する甲状腺ホルモンの作用の硬骨魚類一般への普遍化の可能性が検証されている。本研究で得られた知見のうち、審査委員一同は以下の諸点を特に高く評価した。

まず、本研究ではサケ科魚の卵濾胞の構成要素のうち、特に莢膜細胞が甲状腺ホルモンの標的組織として初めて特定されている。すなわち生体外で培地に添加された産生型 T 4 の活性型 T 3 への代謝量は莢膜細胞層では顆粒膜細胞層に比して3.5倍と高く、しかも莢膜細胞内に取り込まれた T 4 は直ちに T 3 に代謝されて細胞外に放出されることが示唆された。また卵濾胞細胞層には放射性 T 3 の特異的取り込みがあり、それが莢膜細胞層で顕著で顆粒膜細胞層では認められないことを実証した。

甲状腺ホルモンの卵濾胞における生物作用を解析するため、サクラマス雌の性成熟に伴う甲状腺ホルモンの血中量の変動を追跡して、T 3 および T 4 の血中量が卵黄形成開始前にピークをみせ、卵黄形成盛期に相対的に低い値を保ったのち卵黄形成完了後にさらに減少することを明らかにした。生体外での卵濾胞による甲状腺ホルモンの特異的取り込み率も血中甲状腺ホルモン量の変動と一致する推移をみせたことから申請者は、甲状腺ホルモンが卵濾胞に直接作用して卵巣の GtH に対する感受性の増大や肝臓におけるビテロゲニン産生細胞の増数を刺激する可能性について論及している。

また卵濾胞の重要な機能の一つである性ステロイド産生に対する甲状腺ホルモンの作用を生体外実験で追及した結果、T 3 はサケ GtH の存在下でのみサケ科魚の卵濾胞莢膜細胞層におけるプロゲステロンの合成と卵核胞崩壊 (CVBD) を促進することを確認し、T 3 が莢膜細胞層の GtH に対する感受性を高めてステロイド合成、さらには卵母細胞の最終成熟誘起機構に関与する可能性を考察している。

繁殖期に光周期と同期して連日の産卵を行うメダカでは T 3 と T 4 の血中量は次回の産卵前の36時間前と12時間前の卵母細胞の卵黄形成期にピークをみせるのみならず、その最終成熟期にも相対的に高値をとり、甲状腺ホルモンの卵母細胞最終成熟への関与を強く示唆した。またエストラジオール (E 2) の血中量は甲状腺ホルモンのピークのそれぞれ4時間前にピークをみせた。事実、生体外では T 3 は GtH の存在下で産卵前32時間の卵濾胞における E 2 の合成を促進することが立証され、これを論拠に甲状腺ホルモンと性ステロイド合成との関わりが強調されている。またアユでは T 3 が卵母細胞に直接作用して、その卵成熟誘起物質に対する反応性を高める可能

性が生体外実験により確かめられていると共に、T3投与雌のみを収容した水槽に成熟雄の飼育水を注入すると排卵率が対照雌に比して有意に上昇することを実証して、甲状腺ホルモンがアユ雌の雄性フェロモンに対する感受性を高める可能性について興味ある論議を展開している。

以上のように本研究は、魚類の卵巣が甲状腺ホルモンの標的器官の一つであり、特に卵濾胞の莢膜細胞がその主要な標的部位として甲状腺ホルモンの作用下でGtHの効果の増強をみせることを初めて指摘するなど、甲状腺ホルモンの魚類の生殖機構との関係に多くの新知見を加えたものとして高く評価できる。よって審査員一同は本研究が博士（水産学）の学位を受けるに十分な内容を持つと判定した。