

学 位 論 文 題 名

Immunohistochemical studies on gonadotropins
and thyrotropin in some teleost fishes.

（数種の硬骨魚類の生殖腺刺激ホルモンおよび甲状腺
刺激ホルモンに関する免疫組織化学的研究）

学位論文内容の要旨

魚類においても他の脊椎動物同様、生殖腺の発達、脳下垂体から分泌される生殖腺刺激ホルモン（GTH）によって調節されている。現在、水産増養殖において対象魚の繁殖を制御する目的で、魚類の脳下垂体や哺乳類の GTH の投与が広く行われている。様々な成熟段階にある対象魚への GTH 処理技術を確立するためには、魚類における GTH の機能の解明が必要である。魚類では、GTH I および GTH II と名付けられた 2 種類の GTH の存在が、サケ科魚類をはじめ、数種の硬骨魚で報告されている。しかし、多くの哺乳類での GTH である濾胞刺激ホルモンおよび黄体形成ホルモンに比べ、GTH I および GTH II の機能についての研究は少ない。さらに、実際に GTH 投与により催熟を行っているニホンウナギ（*Anguilla japonica*）では、卵黄形成は比較的容易に進行するものの卵成熟は進行し難く、個体間の差も大きいといった問題点が指摘されている。これらの問題点を解決するためには脳下垂体での GTH の合成の動態を把握し、投与魚自身の GTH を最大限に利用することが非常に有効であると考えられる。そこで、本研究では、日本の水産業において重要な位置を占める魚種の中から、自発的に生殖腺の発達が進行する魚種としてサクラマス（*Oncorhynchus masou*）を、また、ホルモン処理が必要な魚種としてニホンウナギを主な材料として選び、脳下垂体中の GTH の変化を免疫組織化学的に解析した。

最初に、解析に必要な特異抗体の作製を試みた。GTH I および GTH II に加えて、甲状腺刺激ホルモン (TSH) は、共通の α サブユニットとホルモン特異的な β サブユニットからなり、構造上多くの類似点が存在するため、その精製が困難であり、抗体は互いに交差することが予想される。また、ニホンウナギでは GTH 含量が低いため、抗体作製に必要な量の精製タンパクを得ることが困難である。従って、従来の方法では特異的な抗体の作製は非常に困難であると考えられる。そこで、配列が不明なニホンウナギ GTH I β を除き、ニホンウナギおよびサクラマス各サブユニットについて特異的なアミノ酸配列に相当するペプチドを合成し、それを抗原とした。作製した抗体はウェスタンブロット解析および免疫組織化学的解析により、高い特異性を有することを確認した。

次に、得られた抗体を用いて、サクラマス脳下垂体中における各免疫陽性細胞について画像解析を行い、一細胞当たりの断面積、一切片当たりの細胞数および脳下垂体中に占める体積パーセントを算出した。その結果、GTH I β および GTH II β 免疫陽性細胞はともに生殖腺の発達または加齢により一細胞当たりの断面積および一切片当たりの細胞数の増加が認められた。一方、TSH β 免疫陽性細胞では増加が見られたのは一細胞当たりの断面積のみであった。このことから、GTH I および GTH II 産生細胞は成熟に伴って肥大および増数することが示された。また、TSH 産生細胞は成熟に伴って肥大するものの増数はしないことが示唆された。

さらに、ウナギの GTH I 産生細胞を検索するために、GTH II β 、TSH β および GTH/TSH α に対する抗体を用い、天然で採捕された下りニホンウナギ (卵黄形成初期) および下りニュージーランドウナギ (*A. dieffenbachii*; 卵黄形成中期) について、免疫二重染色を行い、各免疫陽性細胞の形態計測を行った。その結果、ウナギの脳下垂体主葉基部に抗 GTH II β 抗体および抗 TSH β 抗体で染色されない GTH/TSH α 免疫陽性細胞 ($\beta^- \alpha^+$ 細胞) が観察された。これらの細胞は、卵黄形成の進行した群ほど面積、数および体積パーセントにおいて有意に高値を示

した。同様にシロサケの脳下垂体においては、 $\beta^{-}\alpha^{+}$ 細胞は抗 GTH $\text{I}\beta$ 免疫陽性細胞と一致したことから、天然で成熟しているウナギの $\beta^{-}\alpha^{+}$ 細胞は GTH I 産生細胞と考えられた。一方、GTH $\text{II}\beta$ 免疫陽性細胞および TSH β 免疫陽性細胞については生殖腺の発達した群ほど面積、数共に有意に高値を示したが、体積パーセントにおいて差は認められなかった。これらの結果から、ウナギでは少なくとも卵黄形成中期までは、卵黄形成に伴って GTH I 産生細胞は肥大および増数し、GTH II および TSH 産生細胞は肥大するが増数はしないものと推察された。

次に、シロサケ脳下垂体ホモゲネート (sPH) 投与した養殖ニホンウナギについて同様に免疫二重染色による形態計測を行った。その結果、卵径および GSI の増加に従って、GTH $\text{II}\beta$ 免疫陽性細胞の断面積、数および体積パーセントは著しく増大した。しかし、これらの計測値は投与回数とは必ずしも比例しなかった。また、遅くとも投与 5 回目より脳下垂体主葉端部 (RPD) に GTH $\text{II}\beta$ 免疫陽性細胞が出現することが観察された。これらの RPD の GTH $\text{II}\beta$ 免疫陽性細胞も脳下垂体主葉基部 (PPD) のものと同様の変化を示した。PPD および RPD の GTH $\text{II}\beta$ 免疫陽性細胞について、同程度の GSI の天然魚と比較したところ有意な違いは見られなかった。卵黄形成後期のサクラマスと比較すると同じステージの催熟魚は面積および体積パーセントについて著しく高値を示した。また、TSH β 免疫陽性細胞も卵径および GSI の増加に従って、緩やかに断面積が増大したが、投与回数とは比例しなかった。細胞数および体積パーセントについては、大きな変化は見られなかった。同程度の GSI の天然魚と比較したところ、ニュージーランドウナギで断面積および数において有意に高値を示したが、体積パーセントにおいては有意な違いは見られなかった。一方、 $\beta^{-}\alpha^{+}$ 細胞は催熟を通して断面積に変化は見られなかった。しかし、細胞数および体積パーセントは sPH 投与により有意に減少した。これらの細胞は対照群または、投与によっても生殖腺の発達が見られない個体で、投与前の個体と同様に観察された。この投

与前の個体で観察された $\beta^{-}\alpha^{+}$ 細胞数は、催熟によって急増した GTH II β 免疫陽性細胞数とほぼ同等の値を示した。 $\beta^{-}\alpha^{+}$ 細胞についても同程度の GSI の天然魚と比較したところ、ニホンウナギでは有意な差は認められなかったが、ニュージーランドウナギで断面積、数および体積パーセントにおいて有意に高値を示した。これらの観察から、GTH II 産生細胞は生殖腺の発達に従って肥大および増数することが示された。また、TSH 産生細胞も生殖腺の発達に伴って肥大することが示唆された。催熟前の個体で天然魚よりも多く存在する $\beta^{-}\alpha^{+}$ 細胞は、sPH 投与の開始後に急増した GTH II β 免疫陽性細胞とほぼ等しいことから、投与前の個体で見られる $\beta^{-}\alpha^{+}$ 細胞のほとんどは β サブユニットの合成が低い GTH II 産生細胞と考えられた。しかし、 $\beta^{-}\alpha^{+}$ 細胞の面積は催熟によって変化しないことから、GTH I 産生細胞と考えられる $\beta^{-}\alpha^{+}$ 細胞も脳下垂体中に存在し、sPH 投与によって増数しないことが示された。このことから、ニホンウナギの脳下垂体中では、少なくとも催熟中には GTH I が非常に微量にしか存在しないことが示唆された。

以上の結果から、サクラマスおよびニホンウナギにおいて、成熟に伴う GTH I、GTH II および TSH 産生細胞の変化がほぼ明らかとなった。特に、飼育環境下のニホンウナギの脳下垂体中には β サブユニットの合成が低い GTH II 産生細胞が多数存在し、GTH I 産生細胞も少ないことが示された。これらの事実は本種が飼育下では生殖腺が発達しないことと関連があると推察された。さらに、脳下垂体投与によって GTH I 産生細胞は活性化されず、逆に GTH II 産生細胞は過剰に肥大することが明らかとなった。

学位論文審査の要旨

主査	教授	山内	皓平
副査	教授	山崎	文雄
副査	教授	原	彰彦
副査	助教授	上田	宏
副査	助教授	足立	伸次

学位論文題名

Immunohistochemical studies on gonadotropins and thyrotropin in some teleost fishes.

(数種の硬骨魚類の生殖腺刺激ホルモンおよび甲状腺
刺激ホルモンに関する免疫組織化学的研究)

硬骨魚類においても他の脊椎動物同様、生殖腺の発達は、脳下垂体から分泌される生殖腺刺激ホルモン (GTH) によって調節されている。現在、水産増養殖において対象魚の繁殖を制御する目的で、魚類の脳下垂体や哺乳類の GTH の投与が広く行われている。様々な成熟段階にある対象魚への GTH 処理技術を確立するためには、魚類における GTH の機能の解明が必要である。魚類では、GTH I、GTH II と名付けられた 2 種類の GTH の存在が、サケ科魚類をはじめ、数種の硬骨魚で報告されている。しかし、多くの哺乳類での GTH である濾胞刺激ホルモンおよび黄体形成ホルモンに比べ、GTH I および GTH II の機能についての研究は少ない。さらに、実際に GTH 投与により催熟を行っているニホンウナギでは、卵黄形成は比較的容易に進行するものの卵成熟は進行し難く、個体間の差も大きいといった問題点が指摘されている。これらの問題点を解決するためには脳下垂体での GTH の合成の動態を把握し、投与魚自身の GTH を最大限に利用することが非常に有効であると考えられる。そこで、本研究では、日本の水産業において重要な位置を占める魚種の中から、自発的に生殖腺の発達が進行する魚種としてサクラマス、ホルモン処理が必要な魚種としてニホンウナギを主な材料として選び、脳下垂体中の GTH の変化を免疫組織化学的に解析した。得られた結果は以下の通りである。

最初に、作製が非常に困難である特異抗体を合成ペプチドを抗原に用いること

で、各ホルモンのサブユニットについて得た。作製した抗体はウェスタンブロット解析および免疫組織化学的解析により、高い特異性を有することが確認された。

次に、得られた抗体を用いて、サクラマス脳下垂体中における各免疫陽性細胞について画像解析を行い、一細胞当たりの断面積、一切片当たりの細胞数および脳下垂体中に占める体積パーセントを算出した。その結果、GTH I および GTH II 産生細胞は成熟に伴って肥大および増数することが示された。また、TSH 産生細胞は成熟に伴って肥大するものの増数はしないことが示唆された。

さらに、ウナギの GTH I 産生細胞を検索するために、GTH II β 、TSH β および GTH/TSH α に対する抗体を用い、天然で採捕した下りニホンウナギおよび下りニュージーランドウナギについて、免疫二重染色を行い、各免疫陽性細胞の形態計測を行った。その結果、ウナギの脳下垂体主葉基部に GTH I 産生細胞と考えられる抗 GTH II β 抗体および抗 TSH β 抗体で染色されない GTH/TSH α 免疫陽性細胞 (β -- α + 細胞) が観察された。同様にシロサケの脳下垂体においては、 β -- α + 細胞は抗 GTH II β 免疫陽性細胞と一致したことから、天然で成熟しているウナギの β -- α + 細胞は GTH I 産生細胞と考えられた。また、形態計測の結果より、ウナギでは少なくとも卵黄形成中期までは、卵黄形成に伴って GTH I 産生細胞は肥大および増数し、GTH II および TSH 産生細胞は肥大するが増数はしないものと推察された。

次に、シロサケ脳下垂体ホモゲネート (sPH) 投与した養殖ニホンウナギについて同様に免疫二重染色による形態計測を行った。その結果、GTH II 産生細胞は生殖腺の発達に従って肥大および増数することが示された。また、TSH 産生細胞も生殖腺の発達に伴って肥大することが示唆された。催熟前の個体で天然魚よりも多く存在する β -- α + 細胞は、sPH 投与の開始後に急増した GTH II β 免疫陽性細胞とほぼ等しいことから、投与前の個体で見られる β -- α + 細胞のほとんどは β サブユニットの合成が低い GTH II 産生細胞と考えられた。しかし、 β -- α + 細胞の面積は催熟によって変化しないことから、GTH I 産生細胞と考えられる β -- α + 細胞も脳下垂体中に存在し、GTH 投与によって増数しないことが示された。このことから、ニホンウナギの脳下垂体中では、少なくとも催熟中には GTH I が非常に微量にしか存在しないことが示めされた。また、飼育環境下のニホンウナギの脳下垂体中には β サブユニットの合成が低い GTH II 産生細胞が多数存在することが示唆され、これらが本種の飼育下で生殖腺の発達が進行しないことと関連があると考えられた。さらに、脳下垂体投与によって GTH I 産生細胞は活性化されず、逆に GTH II 産生細胞は過剰に肥大することが明らかとなった。

上述のように、本研究では、サクラマスおよびニホンウナギでの自発的なまた

は、ホルモン投与による生殖腺の発達に伴う脳下垂体中での GTH I および GTH II の変化を明らかにした。これらの結果は、硬骨魚類の生殖腺の発達の制御機構の解明に重要な基礎的知見を提供したものと高く評価され、本論文が博士（水産学）の学位請求論文として相当の業績であると評定した。