

学 位 論 文 題 名

Studies on involvement of pituitary-thyroidal axis
during artificial maturation
in the Japanese eel (*Anguilla japonica*)

（人為催熟されたニホンウナギにおける脳下垂体
－甲状腺系関与に関する研究）

学位論文内容の要旨

ニホンウナギ（*Anguilla japonica*）は、水産養殖業において非常に重要な魚種であるが、その種苗はすべて天然のシラスウナギに依存している。ウナギは飼育環境下では生殖腺の発達が起こらないことから、これまで、サケなど他魚種の脳下垂体を未成熟ウナギに連続投与して性成熟を誘起する試みが行われてきた。しかし、安定した成果は得られておらず、人為催熟法の改善が望まれている。ウナギの最適な人為催熟法を確立し、人工種苗を安定して得るためには、生殖腺の発達に関する内分泌機構を詳細に理解する必要がある。硬骨魚類を含む脊椎動物において、生殖現象には、脳下垂体－生殖腺系の各種ホルモンだけではなく、他の内分泌系のホルモンも重要な役割を持つことが明らかにされつつある。中でも、甲状腺ホルモン（サイロキシン；T4 およびトリヨードサイロニン；T3）は生殖にも影響を与えていることが知られている。しかし、ウナギでは性成熟に及ぼす甲状腺ホルモンの影響はほとんど調べられていない。そこで本研究では、まず、人為催熟に伴う甲状腺組織および血中甲状腺ホルモン量の変化を調べた。次に、人為催熟に伴う脳下垂体－甲状腺系の変化を調べるために、脳下垂体中の甲状腺刺激ホルモン β サブユニット（TSH β ）mRNA 量の変化を reverse transcription - polymerase chain reaction（RT-PCR）法により測定した。さらに、人為催熟されたウナギは最終成熟期に達しても血中エストラジオール-17 β （E2）量が高値を示すことから、E2 が脳下垂体－甲状腺系に及ぼす影

響についても検討した。最後に、人為催熟に伴う卵巣内の T3 および T4 量も測定した。

最初に、ニホンウナギ雌の甲状腺組織を組織学的に観察した。ウナギの甲状腺組織は他の魚種と同様に被膜をもたず、その濾胞は下顎内の腹大動脈周辺に散在していた。甲状腺組織は第 1 および第 2 入鰓動脈分岐部にかけて濾胞が集塊をなす傾向があった。サケ脳下垂体ホモゲネート (SPH) 投与により人為催熟されたウナギを用いて、甲状腺の組織学的活性変化を調べた結果、組織学的活性は SPH の投与回数よりも卵母細胞の発達とよく相関して変化した。SPH 投与前の油球期の卵母細胞を持つ個体では、甲状腺の組織学的活性は比較的高く、処理回数が 3 回程度、即ち卵黄形成初期の個体で最高となった。しかし、投与回数 4 - 7 回の卵黄形成中期から後期にかけて低下し、核移動期に最低となった。

次に、放射免疫測定法により、ニホンウナギ雌の人為催熟に伴う血中 T4 および T3 量の変化を調べた。その結果、血中 T4 および T3 量の変化は、甲状腺の組織学的活性をよく反映し、ほぼ同様の変化を示した。SPH 投与前の個体では血中 T4 および T3 量は比較的高値を示し、卵黄形成初期の個体ではさらに増加して最高値に達した。しかし、卵黄形成中期から核移動期にかけてそれらの値は低下し、核移動期には最低値を示した。特に、SPH を 40 mg/g 体重の割合で投与したウナギのうち、卵黄形成後期と核移動期に達した個体においては、それぞれ 46% と 76% の個体において血中 T3 量が検出不能となった。これらの結果から、甲状腺ホルモンはウナギでもサケ科魚類同様、卵黄形成期特にその初期において、卵母細胞の発達に重要な役割を果たすことが示唆された。しかし、卵黄形成後期から最終成熟期にかけて血中甲状腺ホルモンが極めて低値となったことはサケ科魚類とは大きく異なっており、人為催熟されたウナギ特有の現象であると推察され、このことが人為催熟の問題点の一つであると考えられた。

次に、人為催熟に伴うニホンウナギ雌脳下垂体中の TSH β mRNA 量の変化を RT-PCR 法により調べた。その結果、SPH 投与前の油球期の卵母細胞を持つ個体では、TSH β mRNA 量はアクチン比で 0.5 程度であったが、卵黄形成初期の個体では、その値はやや増加する傾向にあった。卵黄形成中期の個体では、TSH β mRNA 量はやや低下し、その後、卵黄形成後期から核移動期にかけて有意な増加

が認められた。これらの結果から、先に示した最終成熟期に達した個体にみられる血中甲状腺ホルモン量の低下は、少なくとも脳下垂体での TSH 合成の低下によるものではなく、むしろ逆に血中甲状腺ホルモン量の低下が脳下垂体の TSH β 発現を促進したと思われた。さらに、最終成熟期にみられた TSH β mRNA 量の増加は血中 E2 量の変化と類似しており、E2 が脳下垂体—甲状腺系にも影響を与えていることも示唆された。

そこで、E2 が脳下垂体—甲状腺系に及ぼす影響を調べるために、ニホンウナギ雌を用いて、E2 投与実験を行った。その結果、低濃度（1mg/g-体重）投与群では、甲状腺の組織学的活性は E2 の投与回数の増加に伴い変化した。即ち、投与前の個体では、甲状腺の組織学的活性は比較的高い状態にあったが、処理回数が 6 回から 8 回にかけてその組織学的活性が低下し、8 回で最低となった。また、血中 T3 および T4 量は E2 投与に伴って緩やかに減少し、8 回で最低となった。しかし、脳下垂体の TSH β mRNA 発現は E2 の投与回数の増加に伴い増加し、8 回には投与前の対照群と比べ有意に増加した。加えて、高濃度（5mg/g-体重）E2 の 8 回投与後では、甲状腺の組織学的活性が低濃度実験群よりさらに低値を示した。同様に、血中 T3 および T4 量も有意に減少したが、脳下垂体の TSH β mRNA 発現は有意に増加した。以上の結果から、E2 投与は甲状腺ホルモン産生を低下させることを明らかにし、そのことが脳下垂体の TSH β 発現を促進することを示唆した。

最後に、他魚種で卵中の甲状腺ホルモンが受精後の発生に関与することが示唆されていることから、人為催熟に伴うニホンウナギ卵巣中の T3 および T4 含量を測定した。その結果、1 グラム当たりの T3 および T4 量は、卵母細胞の発達に伴って低下し、核移動期には最低値を示した。しかし、全卵巣中の T3 および T4 量は、卵母細胞の発達に伴って増加し、核移動期には最高値に達した。以上の結果から、人為催熟に伴って卵巣中には甲状腺ホルモンが蓄積されていくが、血中甲状腺ホルモン量が低下するために一定重量当たりの甲状腺ホルモン量は低下し、不足する傾向にあると推察された。

以上のように、本研究では、ニホンウナギの人為催熟に伴う甲状腺組織、血中甲状腺ホルモン量、脳下垂体の TSH β 発現量および卵巣中の甲状腺ホルモン含量

の変化を明らかにするとともに、脳下垂体－甲状腺系に及ぼす E2 の影響を調べた。これらの結果および以前の報告を総合すると、サケ脳下垂体投与により人為催熟された雌ウナギでは、最終成熟期に達しても血中 E2 量が低下せず、むしろ過剰に存在しているために甲状腺ホルモン産生が抑制され、発生に必要とされる卵中の甲状腺ホルモン量が不足する傾向にあると推察された。従って、ニホンウナギの人為催熟法の改善には、最終成熟期にみられる過剰な血中 E2 量の抑制あるいは甲状腺ホルモン投与を検討する必要があると考えられた。

学位論文審査の要旨

主査	教授	山内	皓平
副査	教授	麦谷	泰雄
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

Studies on involvement of pituitary-thyroidal axis during artificial maturation in the Japanese eel (*Anguilla japonica*)

(人為催熟されたニホンウナギにおける脳下垂体
－甲状腺系関与に関する研究)

ニホンウナギ (*Anguilla japonica*) は、水産養殖業において非常に重要な魚種であるが、その種苗はすべて天然のシラスウナギに依存している。ウナギは飼育環境下では生殖腺の発達が起こらないことから、これまで、サケなど他魚種の脳下垂体を未成熟ウナギに連続投与して性成熟を誘起する試みが行われてきた。しかし、安定した成果は得られておらず、人為催熟法の改善が望まれている。ウナギの最適な人為催熟法を確立し、人工種苗を安定して得るためには、生殖腺の発達に関する内分泌機構を詳細に理解する必要がある。硬骨魚類を含む脊椎動物において、生殖現象には、脳下垂体－生殖腺系の各種ホルモンだけではなく、他の内分泌系のホルモンも重要な役割を持つことが明らかにされつつある。中でも、甲状腺ホルモン (T4 および T3) は生殖にも影響を与えていることが知られている。しかし、ウナギでは性成熟に及ぼす甲状腺の影響はほとんど調べられていない。本研究は、人為催熟されたニホンウナギにおける脳下垂体－甲状腺系関与に関して詳細に調べることを目的として行われた。

最初に、人為催熟に伴う甲状腺組織および血中甲状腺ホルモン変化を調べた。ウナギの甲状腺組織は他の魚種と同様に被膜をもたず、その濾胞は下顎内の腹大動脈周辺に散在していた。甲状腺組織は第 1 および第 2 入鰓動脈分岐部にかけて濾胞が集塊をなす傾向があった。サケ脳下垂体ホモゲネート (SPH) 投与により人為催熟されたウナギを用いて甲状腺の組織学的活性及び甲状腺ホルモン量変化を調べた結果、組織学的活性及び甲状腺ホルモン量は SPH の投与回数よりも卵母細胞の発達に伴い変化した。SPH 投与前の油球期の卵母細胞を持つ個体では、甲状腺の組織学的活性及び甲状腺ホルモン量

は比較的高い状態にあったが、卵黄形成初期の個体では、甲状腺の組織学的活性及び甲状腺ホルモン量が最大となり、その後、卵黄形成中期から後期にかけてその組織学的活性及び甲状腺ホルモン量が低下し、核移動期に最低となった。この結果から、人為催熟されたニホンウナギ雌では、甲状腺ホルモンが卵母細胞の発達にも関与することを示唆した。

次に、人為催熟に伴うニホンウナギ雌脳下垂体中の TSH β mRNA 量の変化を RT-PCR 法により調べた結果、SPH 投与前の油球期の卵母細胞を持つ個体では、TSH β mRNA 量はアクチン比で 0.5 程度であったが、その値は卵黄形成後期から核移動期にかけて有意な増加が認められた。この結果から、先に示した最終成熟期に達した個体にみられる血中甲状腺ホルモン量の低下は、少なくとも脳下垂体での TSH 合成の低下によるものではなく、むしろ逆に血中甲状腺ホルモン低下が脳下垂体の TSH β 発現を促進したと思われる。さらに、最終成熟期にみられた TSH β mRNA 量の増加は血中 E2 量の変化とも類似しており、E2 が脳下垂体—甲状腺系にも影響を与えていることも示唆した。

次に、E2 が脳下垂体—甲状腺系に及ぼす影響を調べるために、ニホンウナギ雌を用いて、E2 投与実験を行った結果、低濃度（1mg/g-体重）投与群では、甲状腺の組織学的活性は E2 の投与回数の増加に伴い変化した。投与前の個体では、甲状腺の組織学的活性は比較的高い状態にあったが、処理回数が 6 回から 8 回にかけてその組織学的活性が低下し、8 回で最低となった。また、血中 T3 および T4 量は E2 投与に伴って緩やかに減少し、8 回で最低となった。しかし、脳下垂体の TSH β mRNA 発現は E2 の投与回数の増加に伴い増加し、8 回には投与前の対照群と比べ有意に増加した。加えて、高濃度（5mg/g-体重）E2 の 8 回投与後では、甲状腺の組織学的活性が低濃度実験群よりさらに低値を示した。同様に、血中 T3 および T4 量も有意に減少したが、脳下垂体の TSH β mRNA 発現は有意に増加した。以上の結果から、E2 投与は甲状腺ホルモン産生を低下させることを明らかにし、そのことが脳下垂体の TSH β 発現を促進することを示唆した。

最後に、他魚種で卵中の甲状腺ホルモンが受精後の発生に関与することが示唆されていることから、人為催熟に伴うニホンウナギ卵巣中の T3 および T4 含量を測定した。その結果、1 グラム当たりの T3 および T4 量は、卵母細胞の発達に伴って低下し、核移動期には最低値を示した。しかし、全卵巣中の T3 および T4 量は、卵母細胞の発達に伴って増加し、核移動期には最高値に達した。この結果から、人為催熟に伴って卵巣中には甲状腺ホルモンが蓄積されていくが、血中甲状腺ホルモン量が低下するために一定重量当たりの甲状腺ホルモン量は低下し、不足する傾向にあると推察した。

上述のように、本研究では、人為催熟されたニホンウナギにおける脳下垂体—甲状腺系関与に関する詳細な知見が数多く得られた。これらの結果は、人為催熟により誘導されたウナギの卵黄形成に甲状腺ホルモンが重要な役割を果たしていることを示すものであり、今後、催熟法を改良するうえで極めて重要な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認定した。