



Title	メダカ(<i>Oryzias latipes</i>)の甲状腺におよぼすMethyltestosteroneの影響
Author(s)	西川, 一義; NISHIKAWA, Kazuyoshi
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 27(3-4), 121-128
Issue Date	1976-12
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/23590
Type	departmental bulletin paper
File Information	27(3_4)_P121-128.pdf



メダカ (*Oryzias latipes*) の甲状腺におよぼす Methyltestosterone の影響

西川 一 義*

Influence of Methyltestosterone on the Thyroid Gland
of the Medaka, *Oryzias latipes*

Kazuyoshi NISHIKAWA*

Abstract

Adult males of the medaka, *Oryzias latipes*, were administered with methyltestosterone (MT, 100 $\mu\text{g/g}$ diet) daily for 30 days in October and November under the natural light condition and a constant water temperature of 20°C. After the treatment their thyroid glands were examined, in parallel with histology, by measuring the total ^{131}I incorporation into the gland and by analysing the proportion of organic iodine compounds in the gland on a thin-layer radiochromatogram.

The thyroid glands of MT-treated fish showed a higher histological activity, in terms of the height of epithelial cells and the state of luminal colloid in the thyroid follicles, in comparison with those of controls. Total ^{131}I uptake in the gland was, however, not significantly affected by the treatment. The radiochromatograms indicated that, in the thyroid gland of both MT-treated and control fish, monoiodotyrosine (MIT) and diiodotyrosine (DIT) predominated in amount but triiodothyronine (T_3) and thyroxine (T_4) occurred in trace. In control fish, DIT took a larger proportion than MIT, but in MT-treated ones DIT revealed a notable decrease together with a slight increase in radioactivity of MIT. No significant difference was observed in the relative amounts of iodotyrosines to iodothyronines between MT-treated and control fish. Thus, methyltestosterone appears to act on the thyroid gland of the medaka not only to increase its histological activity but also to influence a certain biosynthetic mechanism of the thyroid hormone.

硬骨魚類の甲状腺機能は多岐にわたる現象と関連して論じられている¹⁾。甲状腺機能と性成熟との関連については未だに明らかではないが、いくつかの魚種では甲状腺機能が生殖周期と関連した変化を示す事が知られている²⁾⁻⁴⁾。メダカ (*Oryzias latipes*) においても組織学的にみた甲状腺活性は生殖腺の周年変化と一致して変化し産卵期には高い水準を維持し、特に雄の甲状腺の組織学的活性は雌のそれに比べより高く、その変化もまたより顕著であることが知られており⁵⁾、甲状腺機能と精巢機能との間になんらかの関連が存在することが示唆される。Matty⁶⁾ は *Sparisoma squalidum* で組織学的に、また Singh⁷⁾⁸⁾ は正常および脳下垂体除去 *Mystus vittatus* で放射性ヨウ素を用い、外因性の雄性ホルモンによりこれらの甲状腺活性が亢進したといえる結果を明らかにしている。

本研究では、メダカ (*Oryzias latipes*) にメチルテストステロンを一定期間投与して、甲状腺の組

* 北海道大学水産学部淡水増殖学講座
(Laboratory of Fresh-Water Fish-Culture, Faculty of Fisheries, Hokkaido University)

織像を観察し、更に放射性ヨード素を用いて、その甲状腺へのとりこみ及びラベルヨードアミノ酸の生成比を測定し、雄性ホルモンの甲状腺への影響を検討した。

本研究にあたって終始懇切な指導と原稿の校閲を賜った北海道大学水産学部高橋裕哉助教授および群馬大学内分泌研究所小屋佐久次講師に深甚なる謝意を表するとともに、本研究に際し多大の便宜を与えられ、また有益なる助言を戴いた群馬大学内分泌研究所滝川決男教授ならびに同研究所薬学研究部の各位に謹んで感謝の意を表する。

材料と方法

本実験には、屋外水槽で飼育したメダカ（ヒメダカ、*Oryzias latipes*）雄成魚を用いた。1975年10月に屋外水槽（15°C）から、対照群と実験群各11尾を10l水槽に移し、エアレーションを施し、自然光条件下、20°Cで30日間飼育した。この間、実験群には、1gあたりメチルテストステロン100 μ gを含む市販養鱒用ペレット粉末を与え、対照群には正常のペレット粉末を与えた。

処理終了の翌日、両群の全個体を¹³¹I水溶液（15 μ Ci/40ml/fish）内に24時間置いたのち、体表の¹³¹Iを洗滌除去し、MS-222で麻酔し体長・体重を測定し、甲状腺を含む下顎部および精巣を摘出した。精巣についてはその重量をはかり生殖腺指数（GSI、精巣重量/体重×100）を求めた。

甲状腺を含む下顎部は、ウエル型ノカウンター（Aloka, TDC-306）で放射活性を測定したのち、両群ともに5個体の甲状腺のそれぞれに0.1% pronase E溶液（phosphate buffer, pH 8.0）0.2mlを加えてホモジェナイズし、37°Cで72時間の酵素水解を行った。酵素水解終了後、10,000rpmで30分間の遠心分離を行いその上清10 μ lを薄層板（Merck, Silica gel G, 厚さ0.25mm）に塗布し、酢酸エチル：メタノール：4N-NH₄OH（7:2:1）で室温下約1.5時間、展開距離15cmで展開を行った。展開後、溶媒をとばしてラジオスクニングを行ったのち、キャリアーの標準物質、即ちサイロキシシン（T₄）、トリヨードサイロニン（T₃）、ジヨードチロシン（DIT）、及びモノヨードチロシン（MIT）をニンヒドリンで呈色させ、そのスポットのシリカゲルを採取し、dioxane系シンチレーター10mlを加え、液体シンチレーションシステム（Beckman, LS 200-B）で放射活性を測定し、各¹³¹I-ヨードアミノ酸の放射活性の比率（各ヨードアミノ酸のcpm/塗布した10 μ lのcpm×100）を求めた。

両群ともに、残りの6個体の甲状腺と精巣は、ブアン液で固定し、常法に従い6 μ のパラフィン切片としてデラフィールドのヘマトキシリン-エオシン染色を施し、組織学的観察に供した。甲状腺濾胞上皮細胞高の測定は、高倍率下で接眼測微計を用いて、各個体少なくとも20個以上の濾胞で行った。

なお、実験開始時に、開始時対照群として10尾を同様に処理した。

結 果

組織学的観察

開始時対照個体の甲状腺濾胞上皮細胞は立方形で、上皮高は平均5.4 μ であり、濾胞腔内にはエオシンに好染する均質なコロイドが充満していた（Fig. 1）。6個体中1個体で、一部の濾胞上皮細胞の細胞質が不定形に顕著に肥大し、ほぼ均質にエオシンに好染する異常な像を見せ、著しい例では濾胞構造を失ったものが観察された（Fig. 2）。これらの結果から開始時対照群の組織学的甲状腺活性はあまり高くないものと思われた。MT処理終了時の対照各個体では、甲状腺濾胞上皮細胞は立方形で、濾胞腔内には均質なコロイドの充満が認められた（Fig. 3）。上皮高は平均4.9 μ で、開始時対照個体のそれとの間に有意な差は認められず、その組織学的活性は開始時対照群と同様低い状態にあるものと思われた。

一方、MT処理個体の甲状腺では、濾胞上皮細胞は典型的な円柱状となり、上皮高は平均9.0 μ と

Table 1. *Thyroid epithelial cell height and gonadosomatic index (GSI) of control and methyltestosterone-treated groups of the medaka, Oryzias latipes.*

Group	No. of fish	Thyroid epithelial cell height (μ)	GSI
Initial control	10(4)*	5.4 \pm 0.8	0.53 \pm 0.12
Control	11(5)	4.9 \pm 1.0	0.79 \pm 0.24
Methyltestosterone	11(5)	9.0 \pm 1.6	0.88 \pm 0.27

Data represent the mean \pm standard deviation.

*Number of fish used for radiochromatographic analyses.

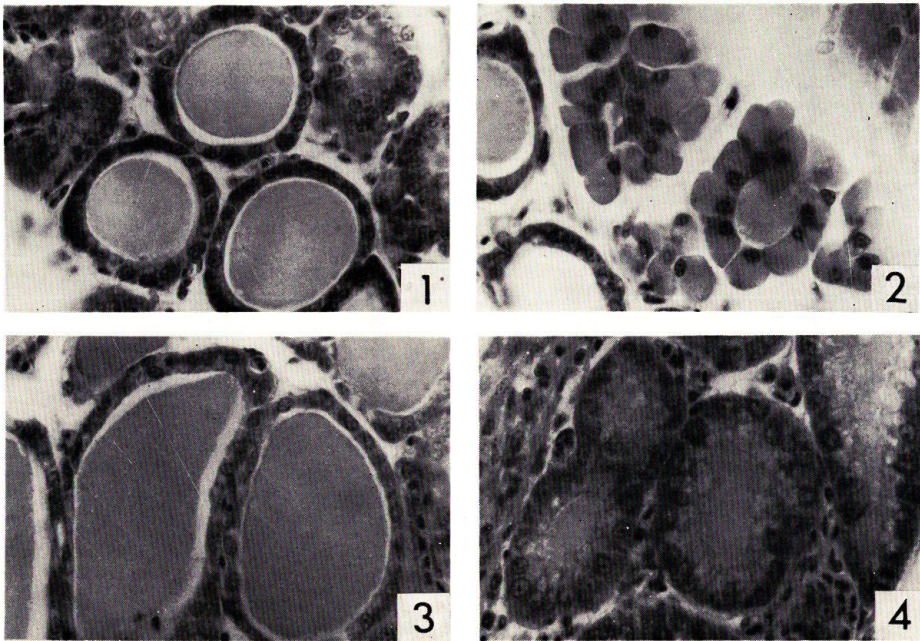


Fig. 1. Thyroid follicles of a control fish at the start of the experiment, showing low histological activity. \times 500.

Fig. 2. Thyroid follicles of an initial control fish, indicating the follicular cells of an atypical asept. \times 500.

Fig. 3. Thyroid follicles of a control fish at the end of the treatment. \times 500.

Fig. 4. Thyroid follicles of a methyltestosterone-treated fish at the end of the treatment. \times 500.

対照個体のそれに比して顕著な肥厚をみせた (Table 1)。上皮細胞の核は細胞の基底部側に位置しており、核周辺の細胞質はヘマトキシリンに濃染するようになり、濾胞腔内のコロイドの減少が認められた (Fig. 4)。これらから、MT 処理によって甲状腺の組織学的活性は上昇したといえる。

^{131}I の取り込みおよび ^{131}I -ヨードアミノ酸の比

甲状腺の ^{131}I の取り込みには、個体差が著しく、三群間で有意な差はなかった (Fig. 5)。三群と

Table 2. Ratios of four ¹³¹I-labeled iodocompounds in control and methyltestosterone-treated groups of the medaka, *Oryzias latipes*.

Group	Percentage of iodocompounds*	Iodotyrosines: iodothyronines	MIT : DIT	T ₃ : T ₄
Initial control	58.2±11.4	34.9±16.1	0.39±0.29	0.58±0.31
Control	75.7±5.0	78.3±23.9	0.76±0.14	0.51±0.24
Methyltestosterone	70.0±9.1	54.9±26.4	1.80±0.39	0.45±0.10

Data express the mean±standard deviation.

*Sum radioactivity of MIT, DIT, T₃ and T₄/total radioactivity × 100.

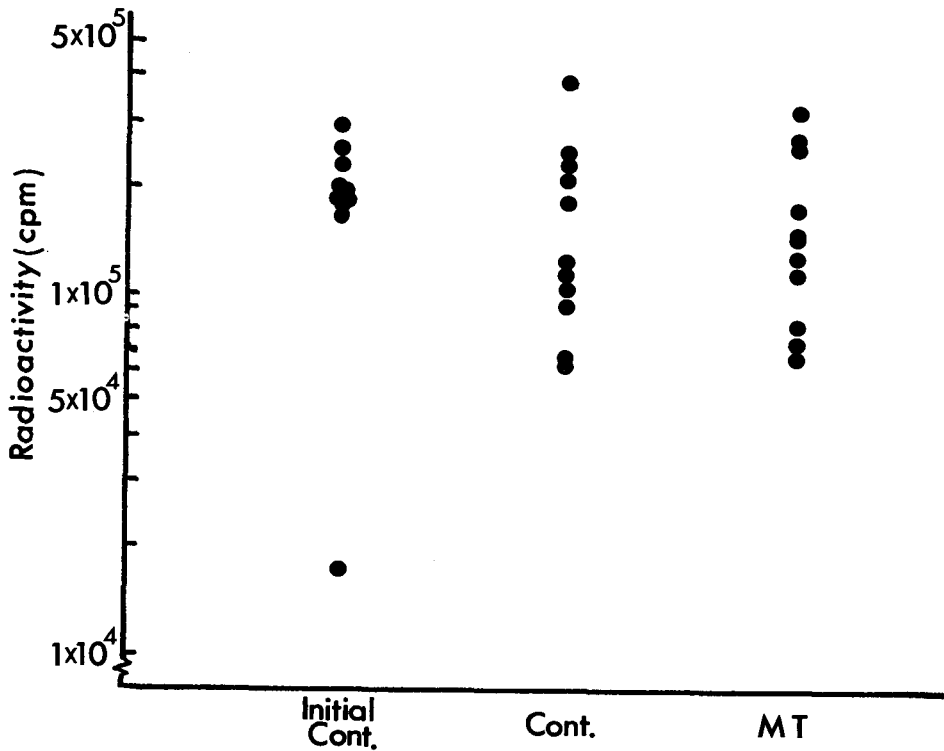


Fig. 5. Total ¹³¹I uptake by the thyroid gland in methyltestosterone-treated (MT) and control groups of the medaka. The values are plotted on logarithmic scales.

もに、甲状腺内における ¹³¹I-ヨードアミノ酸の比では大部分を MIT と DIT が占め、T₃ と T₄ はきわめて低い割合を示し、この結果は、三群ともにはほぼ同様であった (Fig. 6)。しかし、MIT および DIT の割合には、三群間で明らかな差異があり、MIT/DIT の値は、処理終了時対照群において処理開始時対照群におけるよりも大となる傾向はあったが、統計的には有意な差はなかった。一方、MT 処理群では両対照群と比べ MIT の僅かな増加と DIT の減少が明らかであり、MIT/DIT の値は 1.8 と MIT>DIT の関係を示した (Table 2 および Fig. 6)。

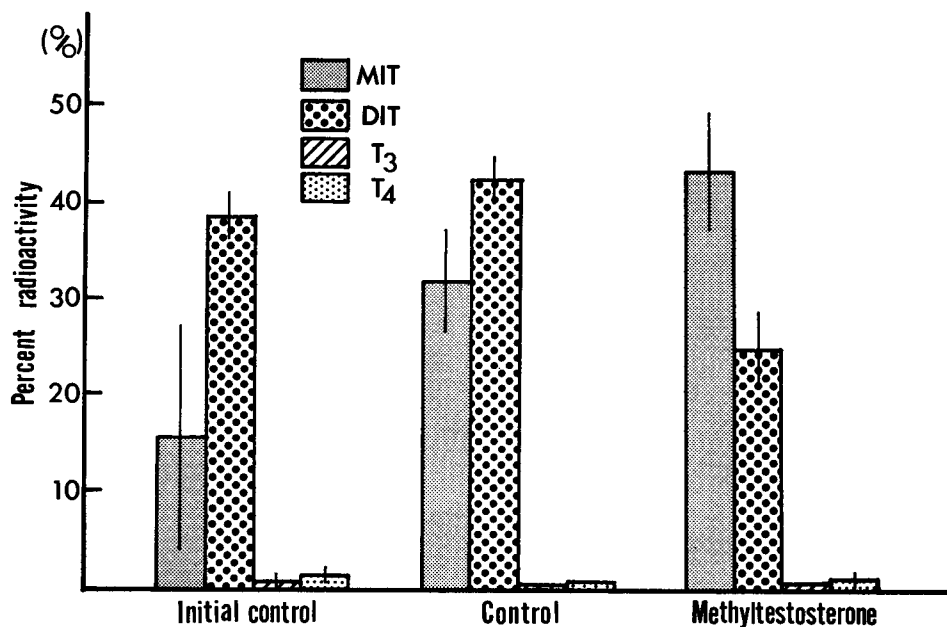


Fig. 6. Effect of methyltestosterone on percentage distribution of ^{131}I -labeled monoiodotyrosine (MIT), diiodotyrosine (DIT), triiodothyronine (T_3) and thyroxine (T_4) in the thyroid gland of the medaka. The vertical bars on each column indicate the standard deviation of the mean.

甲状腺にとりこまれ有機化された ^{131}I の割合は、処理開始時対照群に比し、MT 処理群、対照群において大となるようであった (Table 2)。さらに、ラジオスキャニングクロマトグラムから、処理開始時対照群では無機ヨードのピークが顕著に認められたが、MT 処理群、対照群ではそのピークはきわめて低かった (Fig. 7)。一方、ヨードチロシン/ヨードサイロニンの値には、MT 処理群と対照群では有意な差が認められなかった (Table 2)。

精巣に対する効果

GSI は、処理開始時には平均 0.53 であったが、処理終了後対照群では平均 0.79、MT 処理群では 0.88 と増加していた (Table 1)。しかし、三群ともに精巣内には精子形成の全ての段階の生殖細胞が存在しており、その組織像には差がなかった。

考 察

メダカ甲状腺の組織学的にみた活性は、生殖周期と一致した季節的変動を示し、産卵期には高い活性を維持し、特に雄の甲状腺の上皮細胞高は雌のそれに比して大であり、その変化も顕著である⁵⁾。さらに、Takahashi and Iwasaki⁹⁾ は、産卵期のメダカでは組織化学的にみた精巣のステロイド合成能が高まっている事を明らかにしており、これらの事実は、産卵期において雄の甲状腺が雌のそれよりも顕著な機能亢進像を示すのは雄性ホルモン影響によるものである可能性を示唆するものと考えられる。Matty⁶⁾ は *Sparisoma squalidum* で、雄性ホルモン処理が甲状腺を組織学的に活性化し得る事を

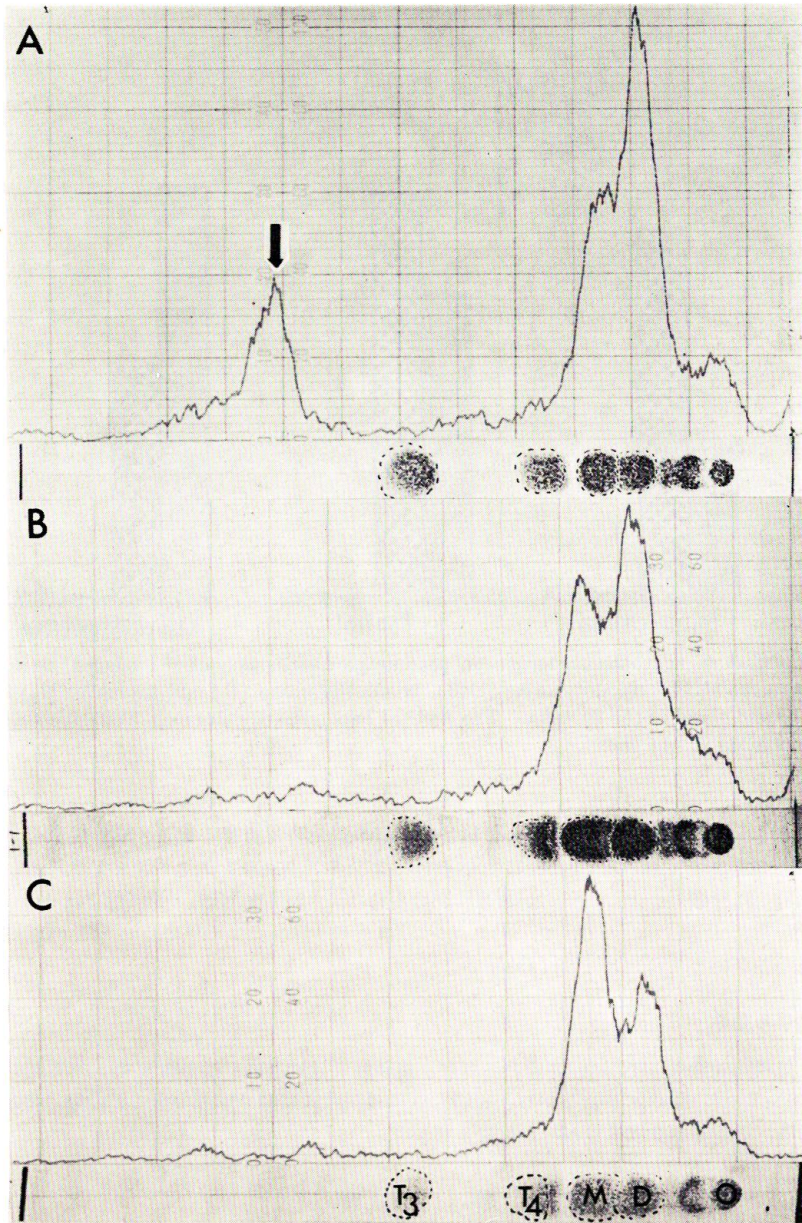


Fig. 7. Thin-layer radiochromatograms of pronase E hydrolysates of the thyroid tissue of initial control (A), control (B), and methyltestosterone-treated groups (C) of the medaka after a 24-hr immersion in radioiodine solution. Figures show the distribution of radioactivity along the length of chromatograms. The position of the known iodinated compounds, chromatogramed in parallel with the thyroid hydrolysates, is indicated at the bottom of each figure. Arrow in A reveals the occurrence of the peak of inorganic iodine. D, diiodotyrosine; M, monoiodotyrosine; O, origin; T₃, triiodothyronine; T₄, thyroxine.

また Singh⁷⁹⁾ は *Mystus vittatus* の正常個体および脳下垂体を剔除した個体を用いて ^{131}I の % uptake をみた結果から甲状腺機能の亢進を報告している。

本研究においても、開始時対照群、終了時対照群ともに低かった組織学的甲状腺活性が、MT 処理群では顕著な上昇をみせた。一方、甲状腺の ^{131}I の uptake には差が見られなかったが、甲状腺の MIT と DIT の比には顕著な変化が認められた。両対照群では MIT<DIT であったのが、MT 処理群では MIT>DIT と明らかに変化を示した。これは MT 処理群における、MIT の僅かな増加と DIT の顕著な減少による結果である。しかし、Berg and Gorbman¹⁰⁾ はキンギョ、*Carassius auratus*, で、TSH 処理により甲状腺活性が増大しても MIT<DIT の関係は変動しない事を報告しており、また Hanaoka *et al.*¹¹⁾ はニホンヒキガエル、*Bufo bufo japonica*, で変態にともなう甲状腺活性の上昇に従い、DIT が増加すると述べている。即ち、これまでの報告では甲状腺ホルモンの生合成機能が高まっている場合には、MIT<DIT の関係が示されており、今回の MT 処理の実験では、組織像は明らかな亢進像を示したにもかかわらず、 ^{131}I -ヨードアミノ酸の比からは MIT>DIT となり、これまでの報告からすると一見機能亢進を否定するとも思われる結果が得られたわけである。この点は今後さらに検討を加える必要があるが、この点に関しメダカが特異的なのかどうかきわめて興味あることといえる。いづれにしても、MT 処理が、甲状腺ホルモンの生合成機構に何らかの影響を与えているものと思われる。

処理終了時の対照群では、処理開始時に比べ無機ヨードが減少し、ヨードの有機化の割合がやや高まった様な結果を示したが、これらの結果は実験水温が開始時の屋外水温に比べ約 5°C 高い事に起因するものと思われる。開始時対照群で観察された特異な組織像は、西川⁹⁾ が不応期¹²⁾ のメダカ甲状腺で観察した像と類似しており、興味深い問題である。

Singh⁹⁾ は脳下垂体を剔除した *Mystus vittatus* で、雄性ホルモンが直接甲状腺を活性化する事を報告しているが、本研究のメダカの場合もメチルテストステロンが甲状腺に直接作用した結果か否かは今後の実験で明らかにしたい。

要 約

メダカ (*Oryzias latipes*) 雄成魚を、10 月から 11 月にかけて、自然光条件、20°C で 30 日間飼育し、メチルテストステロン (MT, 100 µg/g 飼料) を経口投与し、その甲状腺に与える影響を組織学的に、また ^{131}I を用い生化学的に調べた。

MT 処理群では甲状腺の組織学的活性は顕著な上昇を示した。しかし、 ^{131}I のとりこみには有意な差はみられなかった。甲状腺内の ^{131}I -ヨードアミノ酸の大部分は MIT と DIT が占め、 T_3 と T_4 は微量であった。

MIT と DIT の比は、対照群では MIT<DIT であったが、MT 処理群では MIT>DIT と逆転をみせた。甲状腺のヨードの有機化は、MT 処理群および処理終了時対照群では開始時に比べ高まった。又、MT 処理群ではヨードチロシンとヨードサイロニンの割合には対照群に比べ有意な差は認められなかった。

以上の結果から、メチルテストステロンは甲状腺に対し、形態的变化のみでなく、甲状腺ホルモン生合成機構にも何らかの影響を与えているものと思われる。

文 献

- 1) Pickford, G.E. and Atz, J.W. (1957). *The physiology of the Pituitary Gland of Fishes*. 613p. N.Y. Zool. Soc., New York.
- 2) Berg, O., Gorbman, A. and Kobayashi, H. (1959). The thyroid hormones in invertebrates and lower vertebrates. p. 302-319. In Gorbman, A. (ed.), *Comparative*

- Endocrinology*. 746p. John Wiley & Sons, New York.
- 3) Swift, D.R. (1960). Cyclical activity of the thyroid gland of fish in relation to environmental changes. *Symp. Zool. Soc. London* 2, 17-27.
 - 4) Hickman, C.P. (1962). Influence of environment on the metabolism of iodine in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.*, Suppl. 1, 48-62.
 - 5) 西川一義 (1975). メダカ (*Oryzias latipes*) の甲状腺の組織学的活性について. 北大水産彙報 26, 23-30.
 - 6) Matty, A.J. (1960). Thyroid cycles in fish. *Symp. Zool. Soc. London* 2, 1-15.
 - 7) Singh, T.P. (1968). Thyroidal ^{131}I uptake and TSH potency of the pituitary in response to graded doses of methyltestosterone in *Mystus vittatus* (Bloch). *Gen. Comp. Endocrinol.* 11, 1-4.
 - 8) Singh, T.P. (1968). Observations on the effects of gonadal and adrenal steroid upon thyroid gland in hypophysectomized catfish, *Mystus vittatus* (Bloch). *Ibid.* 12, 556-560.
 - 9) Takahashi, H. and Iwasaki, Y. (1973). Histochemical demonstration of 4^{β} - 3β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in the testis of the medaka, *Oryzias latipes*. *Endocrinol. Japon.* 20, 529-534.
 - 10) Berg, O. and Gorbman, A. (1954). Normal and altered thyroidal function in domestic goldfish, *Carassius auratus*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 86, 156-159.
 - 11) Hanaoka, Y., Koya, S.M., Kondo, Y., Kobayashi, Y. and Yamamoto, K. (1973). Morphological and functional maturation of the thyroid during early development of anuran larvae. *Gen. Comp. Endocrinol.* 21, 410-423.
 - 12) Yoshioka, H. (1966). On the effects of environmental factors upon the reproduction of fishes. 3. The occurrence and regulation of refractory period in the photo-periodic response of medaka, *Oryzias latipes*. *J. Hokkaido Univ. Educ.*, Sect. IIB 17, 23-33.