



# HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	キングヨ雄における飢餓および片側精巢除去の影響と飢餓キングヨによる性腺刺激ホルモン活性生物検定の試み
Author(s)	笹山, 雄一; SASAYAMA, Yuichi; 高橋, 裕哉 他
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 22(4), 267-279
Issue Date	1972-02
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/23459">https://hdl.handle.net/2115/23459</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	22(4)_P267-279.pdf



キンギョ雄における飢餓および片側精巢除去の影響と飢餓キンギョ  
による性腺刺激ホルモン活性生物検定の試み

笹山 雄一\*・高橋 裕哉\*

Effect of Starvation and Unilateral Castration in Male Goldfish,  
*Carassius auratus*, and a Design of Bioassay for Fish  
Gonadotropin Using Starved Goldfish

Yuichi SASAYAMA\* and Hiroya TAKAHASHI\*

Abstract

1) Maturing male goldfish, *Carassius auratus*, which had been raised at a water temperature of 7–14°C, were unilaterally castrated or sham-operated, and kept in a fed or a completely starved condition at a temperature of 20–23°C in each of the months of December, January and May. After periods of 15 to 60 days, changes in the unilateral gonosomatic index (hGSI) and testicular histology were examined in each of the groups.

2) The elevation of rearing temperature clearly accelerated the maturation of testes of the fed goldfish. Hemicastration caused a significant increase in hGSI associated with a uniform stimulation of whole spermatogenetic phases. Thirty days after the operation, the hGSI of the hemicastrated fish fairly exceeded that of sham-operated ones. A similar acceleration of testicular development, including the compensatory hypertrophy of the remaining testis following hemicastration, was noticed also in starved fish at least during an early period of the treatment. However, the fish that suffered complete starvation lasting for about 45, 30 and 15 days in December, January and May, respectively, came to have their testes with testicular lobules packed with a large amount of spermatozoa in the lumina surrounded by a very thinned wall retaining only a small number of spermatogonia. Concurrently with the *full maturation* of the testis, the starved fish became to lose spermiation by hand-stripping, which was considered to reflect an inhibition of endogenous gonadotropin in the fish. Starvation lasting longer than those periods of days resulted in progressive loss of accumulated spermatozoa and prominent shrinkage of testicular lobules in the treated fish.

3) In an attempt to quantify the potency of gonadotropic hormones, groups of starved goldfish, which had just started to show a disappearance of spermiation associated with the *full maturation* of the testis, were intraperitoneally injected with some gonadotropic substances, and the resulting spermiation response was estimated quantitatively 24 hours after single injection. HCG at dosages of 20, 50 and 100 IU per fish induced a spermiation response which was dependent in degree on the dosage administered. HCG at the dosage of 100 IU caused the evident response in nearly 100% of assay fish. Injection of homogenates of acetone-dried pituitaries of male and female goldfish, collected at January, and May to July, was also effective in eliciting the dose-dependent response in the range of dosages from 1/4 to 1 pituitary per fish. The effectiveness of one pitui-

\* 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)

tary was assessed to be equivalent to a little more than that of 50 IU of HCG, showing no detectable difference in the effect according to the sex. PMS at dosages of 50 and 100 IU caused a slightly positive response, but the response was not dose-dependent. Thus the possible use of the starvation effect for quantitative bioassay of fish gonadotropin is suggested by the present study.

魚類の生殖腺の成熟や排卵・排精などの生殖活動が、哺乳類におけると同じく、脳下垂体の生殖腺刺激ホルモン (GTH) の支配下にあることは広く認められている (Pickford & Atz, 1957, および Yamamoto & Yamazaki, 1967, 参照)。さらに、二、三の実験的研究は魚類における GTH 分泌もまた、生殖腺の分泌する性ホルモンの統御をうけることを示唆している (Robertson, 1958; Egami & Hyodo-Taguchi, 1967; Goswami & Sundararaj, 1968; Sage & Bromage, 1970)。しかしながら魚類の脳下垂体—生殖腺系のこのような機能的相関のもつ生理的意義を明らかにするには、性成熟や生殖の過程に伴う GTH や性ホルモンの量的消長を正確にとらえる必要がある。

魚類の GTH についてのこのような試みには、Fontaine & Chauvel (1961), Barr & Hobson (1964), Blanc & Abraham (1968) などが無尾両生類の排精誘導効果を用いて興味ある成果をあげている。しかし、たん白ホルモンとしての GTH の種属特異性 (Pickford & Atz, 1957, および Hoar, 1969, 参照) を考慮すると、魚類の GTH 活性の測定は魚類にみられる GTH に特異的な反応を目標としてなされることがもっとも妥当と考えられる。Robertson & Rinfret (1957) および Schmidt *et al.* (1965) は、サケ脳下垂体の抽出物が未熟ニジマスの精巣重量を増加させることから、これを GTH の生物学的定量に用いる可能性を示した。また Clemens & Grant (1964, 1965) はコイやニジマスの精巣および精液の水分含量が投与 GTH と量的相関をもって増加することを示し、さらに Yamazaki & Donaldson (1968 a, b) は脳下垂体を摘除した成熟キンギョの排精反応を GTH 生物試験に用いている。しかしながら実験動物としての系統が確立されていない魚類を用いての生物試験では、予測されるその結果の大巾な個体差を考慮して多数の個体を、しかも任意の時期に用いることが望ましい。この見地からすると上記の諸法は必ずしも好適とはいえない。

Clemens & Reed (1967) および Bogenschütz & Clemens (1967 a, b) は、雄キンギョの慢性的な飢餓が精巣の組織学的変化に関して下垂体摘除に似た状態をもたらすことを示し、この現象を用いて諸種のホルモンの配偶子形成活性の量的な検定を行なう可能性を示唆している。本研究は、魚類の GTH の生物学的定量を適確かつより能率的に行なう方法を見いだす目的で、成熟途上のキンギョの精巣におよぼす飢餓の影響を観察し、さらに飢餓キンギョの排精の誘発に基づく GTH の定量化を試みたものである。

稿を進めるに先立ち、本研究に対し終始御懇篤なる御助言を賜わった北海道大学山本喜一郎教授に深甚なる謝意を表す。

#### 材料および方法

本研究には成熟途上にある被鱗体長 4.8~7.8 cm, 体重 3.8~18.8 g の雄のキンギョ, *Carassius auratus*, を用いた。これらは水温 6~10°C (12~1月) から 13~15°C (5月) の流水池で飼育していたものである。1969年12月および1970年1月, 5月に、精巣の初期状態を個体ごとに確認するために左側精巣除去を行ない、腹びれと尾びれの部分切除の組み合わせによって個体識別し、水温 20~23°C の飼育水槽に移して絶食させ (HGx-S 群), 15~60 日後に屠殺し、精巣などの変化を観察した。またこの対照として1月には左側精巣除去の偽手術を施した絶食群 (ShC-S 群) と、各月に同じく左側精巣除去またはその偽手術を施し、かつ十分な餌を与えた群 (HGx-F 群と ShC-F 群) を設定し、HGx-S 群と同様な条件で30日間飼育した。これら各群の飼育は自然光条件下で行ない、また餌としては市販の配合餌料を用いた。

精巣除去手術は MS-222 で軽く麻酔した魚について、Hansen (1931) の方法に準じて行なった。偽手術の場合は左側腹部切開ののち、精巣には触れず傷口を縫合した。手術後 2 週間以内で傷口は完全に治ゆし、手術による死亡はほとんどみられなかった。

実験の開始時および終了時に各個体の体長、体重、精巣重量を測定、精巣は直ちに Bouin 氏液で固定し、定法により  $8\mu$  の切片とし Delafield's hematoxylin-eosin 染色を施して組織学的観察に供した。また、組織学的変化を数量的にとらえるために、精巣切片の一定面積中の成熟精子の占める面積の割合、または精子形成の各段階の細胞の占める面積の割合を投影描写法により測定した。また片側精巣重量の体重に対する百分比を求め、hemi-gonosomatic index (hGSI) としてあらわした。なお、各月の ShC-F 群については精巣重量を左右別に測定し、各々の hGSI について左右による有意差のないことを確かめた。

GTH の量的検定の検討には、泌尿生殖孔上部を圧迫しても排精しなくなった飢餓魚に対して 1 個体あたり人胎盤性性腺刺激ホルモン (HCG; Gonatropin, 帝国臓器) 20~100 IU, 妊馬血清性腺刺激ホルモン (PMS; Serotropin, 帝国臓器) 50, 100 IU, または雌雄キンギョのアセトン乾燥下垂体 1/4~1 個分を 0.6% 生理食塩水 0.2 ml に含むよう調製した液を腹腔内に注射し、注射 24 時間後の排精反応の強さを観察した。対照としては同様な飢餓キンギョに対する 0.6% 生理食塩水 0.2 ml の腹腔内注射を用いた。腹腔内注射は MS-222 で軽く麻酔した後に行ない、体外への漏出を極力防ぐよう配慮した。反応の度合いは Yamazaki & Donaldson (1968 a) の方法に準じ、排精の観察しうる腹部圧迫回数によって、-, ±, +, ++ の 4 段階に区別した。

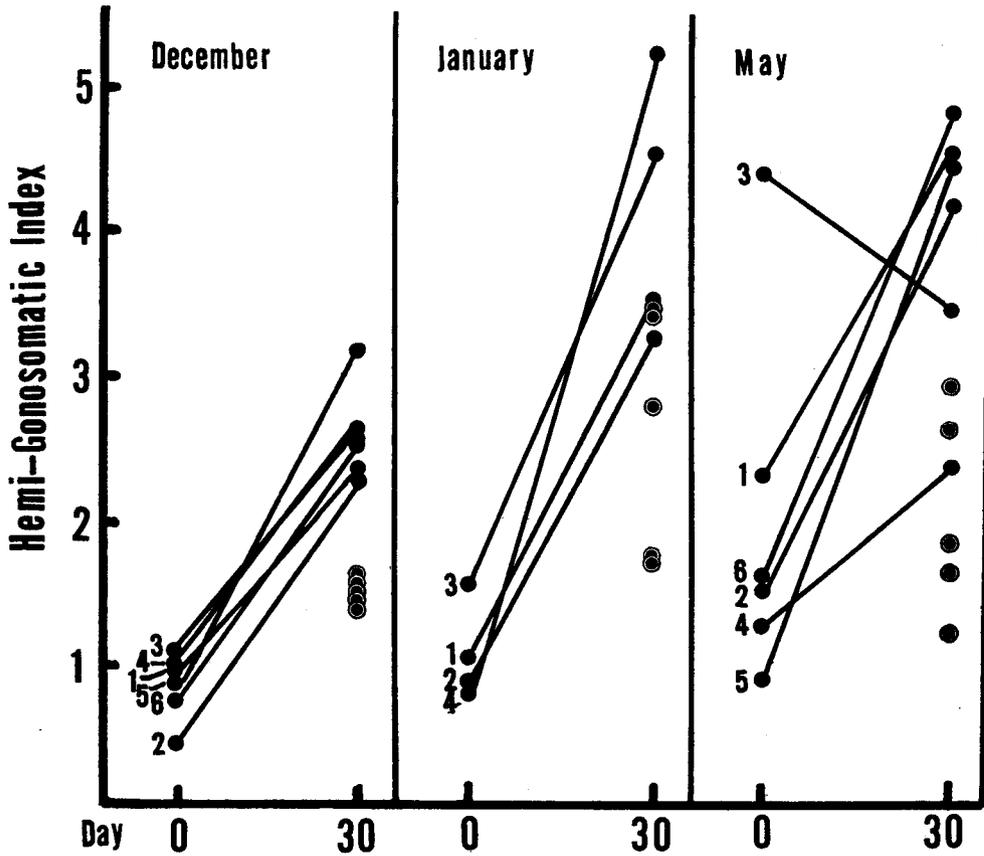
## 実験結果

### 飢餓キンギョの精巣にみられる変化

12 月、1 月の実験開始時まで低水温で飼育されていた雄キンギョでは追い星の発達も顕著でなく、また腹部圧迫による排精もみられなかった。この条件下での精巣の発達はきわめて緩慢であって、12 月、1 月の実験開始時の hGSI はそれぞれ平均 0.80 および 0.95 と大差がなく、また組織学的にも精巣小嚢内腔には少量の精子がみられるのみであった (Figs. 1, 2)。5 月の実験開始時には飼育水温の上昇にともない追い星や排精がみられる個体もあり hGSI は 1.68 と増加をみせ、組織学的な精巣の成熟度もわずかに進んではいたが冬期の群との差は著しくはなかった (Fig. 3)。

各月に水温 20~23°C の水槽へ移された ShC-F 群では精巣の成熟が明らかに促進され、追い星や排精現象の出現とともに、hGSI の増加、成熟精子の増量をとともなう精巣小嚢の拡張が認められた (Figs. 4, 6)。HGx-F 群にも同様な成熟促進がみられるとともに、左側精巣除去に伴う残存精巣のいわゆる補償肥大効果と思われる現象が観察された。すなわち HGx-F 群の hGSI の増加は ShC-F 群のそれに比してはるかに大であり (Text-fig. 1)、精巣増重率を比べてみても後者が 12 月、1 月および 5 月にそれぞれ 51, 142, 44% であったのに対して前者はそれぞれ 200, 290, 143% にも達していた。また成熟精子量の増加、精巣小嚢の拡張も著しかった (Figs. 5, 7) が、精子形成の各段階の生殖細胞の量的比率は ShC-F 群のそれと差がなく、精子形成の全過程の進行が一様に刺激されていることを示していた (Text-fig. 2)。

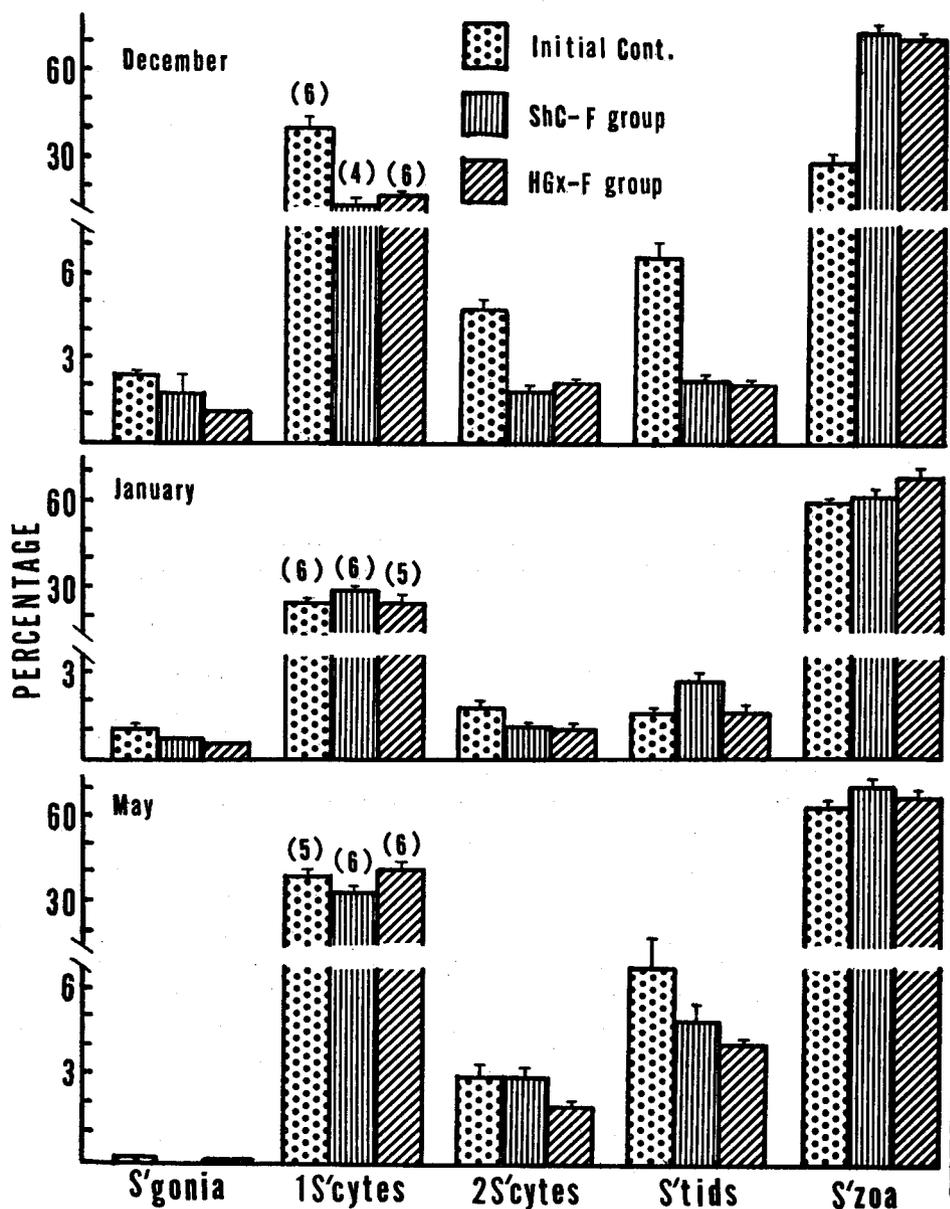
一方、絶食状態におかれた HGx-S 群では、他群と同じく 20~23°C の水温への移行後まもなく追い星の出現や排精の開始をみせた。1 月の処理 15 日目の精巣では、精巣小嚢壁に相対的に多数の精子細胞包囊があり、成熟精子への変態がすすんでいることが認められた (Fig. 8)。処理 30 日目には各精巣小嚢は多量の成熟精子を貯留して著しく拡張しており、小嚢壁には少数の精原細胞と稀に精母細胞または精子細胞の包囊が残存するのみで、きわめて薄くなり、投餌群にはまったくみられなかった。完全に似た状態に達するとともに、処理魚の大部分が腹部圧迫による排精を示さなくなった (Fig. 9)。



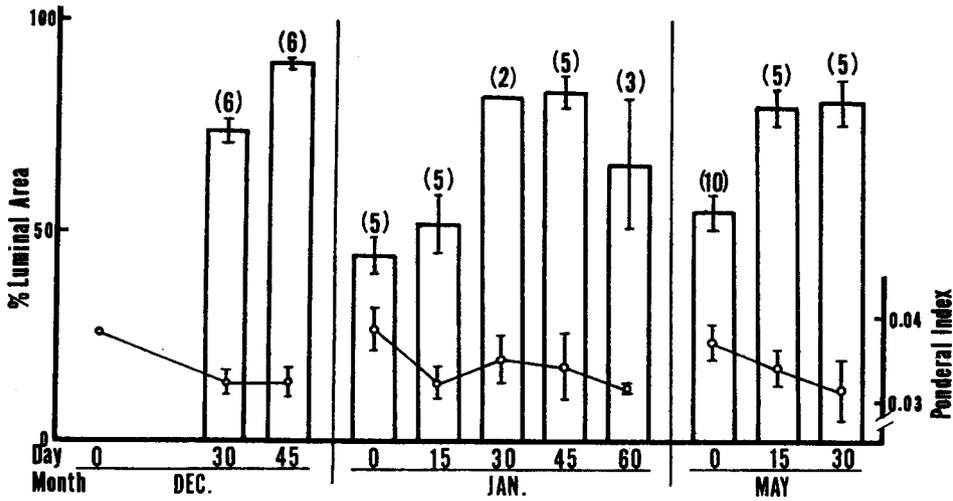
Text-fig. 1. Changes in the hemi-gonosomatic indices (hGSI) of hemicastrated goldfish fed for 30 days in December, January and May. Numerals affixed to each line in the figure indicate the individual number of each fish. The values on each 0 day represent hGSI of the left testes removed at the start, and those on each 30th day that of the remaining right testes examined at the end of the experiment. The values represented by the mark,  $\circ$ , show those of the right testes of sham-operated fish fed for 30 days in each experiment.

偽手術群 (ShC-S 群) の 30 日間絶食処置も精巣に全く同様な変化を惹起した。精巣に対するこのような飢餓効果は処置の時期にかかわらず認められたが、精巣が完熟に似た状態に達するまでの日数は時期によって明らかな差をみせ 12 月には 45 日を要した (Fig. 11) が、5 月には 15 日で十分であった (Fig. 12)。また各月の HGx-S 群の精巣の組織切片について計測した精巣小囊内腔面積の全精巣断面に対する比率は、この組織学的な観察結果とほぼ平行した変化をみせた (Text-fig. 3)。さらに上記の日数以上に絶食処置を継続すると、成熟精子の減少、小囊壁に残存する生殖細胞の退化消失、小囊縮小と壁の肥厚などの退行的変化が次第に著しくなることも確かめられた (Fig. 10)。しかし、この場合にも第 1 次精原細胞は比較的健全な状態にとどまっていた。

HGx-S 群の hGSI は、5 月を除き実験期間の初期に著しい増加をみせた (Text-fig. 4)。絶食による体重、体長の減少は 30 日目でそれぞれ平均 24.48%、3.92% であり、特に処理初期の体重の減少



Text-fig. 2. Percentage composition of different stages of spermatogenesis in the testes of initial control, hemicastrated (30 days) and sham-operated (30 days) goldfish. Vertical lines on top of each column represent the standard error of the mean. Numerals in parentheses on the second row of columns are the number of animals examined in respective groups. S'gonia, spermatogonia; 1 S'cytes, primary spermatocytes; 2 S'cytes, secondary spermatocytes; S'tids, spermatids; S'zoa, spermatozoa.



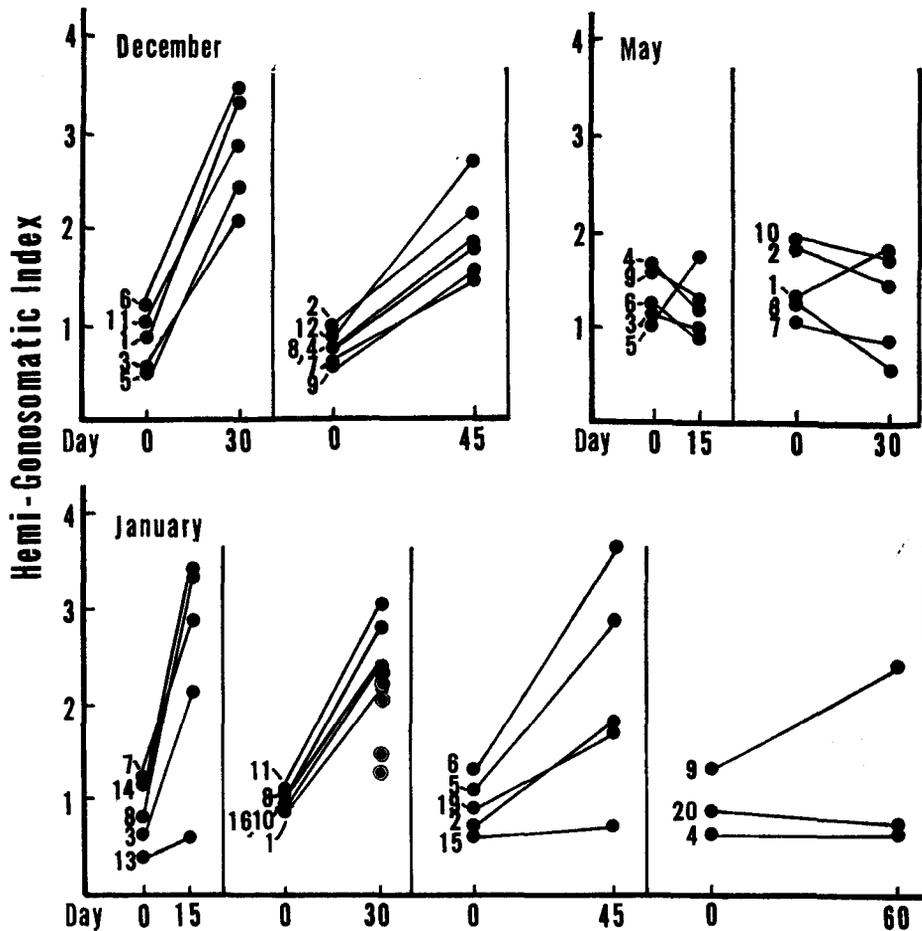
Text-fig. 3. Changes in the relative ratio of testicular luminal area and in the ponderal index in hemicastrated goldfish starved for 15-60 days in December, January and May. Numerals in parentheses on top of each column represent the number of fish examined.

が顕著であって、この傾向は Text-fig. 3 に示した肥満度の変化からもうかがわれた。HGx-S 群の hGSI の増加は一部このような体重減少によるものと考えられるが、精巣の実重量の変化も hGSI のそれと平行しており、たとえば 1 月では片側精巣の実重量の平均は実験開始時に 90.3 mg, 15 日目に 214.5 mg, 30 日目に 185.8 mg と増加が顕著であった。これは同月の投餌群の 30 日目の片側精巣重量の平均 337.6 mg (ShC-F 群), 542.5 mg (HGx-F 群) に比して明らかに小であったが、同月の ShC-S 群の片側精巣重量は 30 日目でも平均 103.6 mg であって、HGx-S 群にも HGx-F 群でみられたと同様な補償肥大の効果があることがわかった。

1 月における 30 日以上 の 飢餓処置は、前述の精巣の退行的変化を反映して hGSI, 精巣実重量の個体による差を拡大する傾向が認められた (Text-fig. 4)。5 月での飢餓処置は、実験開始期の精巣熟度が他の月の群に比して高かったため精巣は 15 日目ですでに完熟に似た状態に達し、多くの個体で hGSI の減少がみられた。また、たとえば Text-fig. 4 に示した 1 月の処理後 15 日目の個体 No. 13 のごとく実験開始期の hGSI が他に比して 0.42 と著しく小である場合には水温上昇および飢餓処置による hGSI の増加は 0.63 と顕著ではなく組織学的にも精巣小嚢内腔面積の全精巣断面に対する比率は 27% で第 2 精母細胞や精子細胞はきわめて少なく、第 2 次精原細胞の包囊が多数存在し、精子形成初期の様相を呈していた。これらの事実はこの種の実験結果の均一性が実験開始期の状態の均一性に依存する面が大であることを推測させた。

#### 飢餓キンギョによる GTH の生物試験

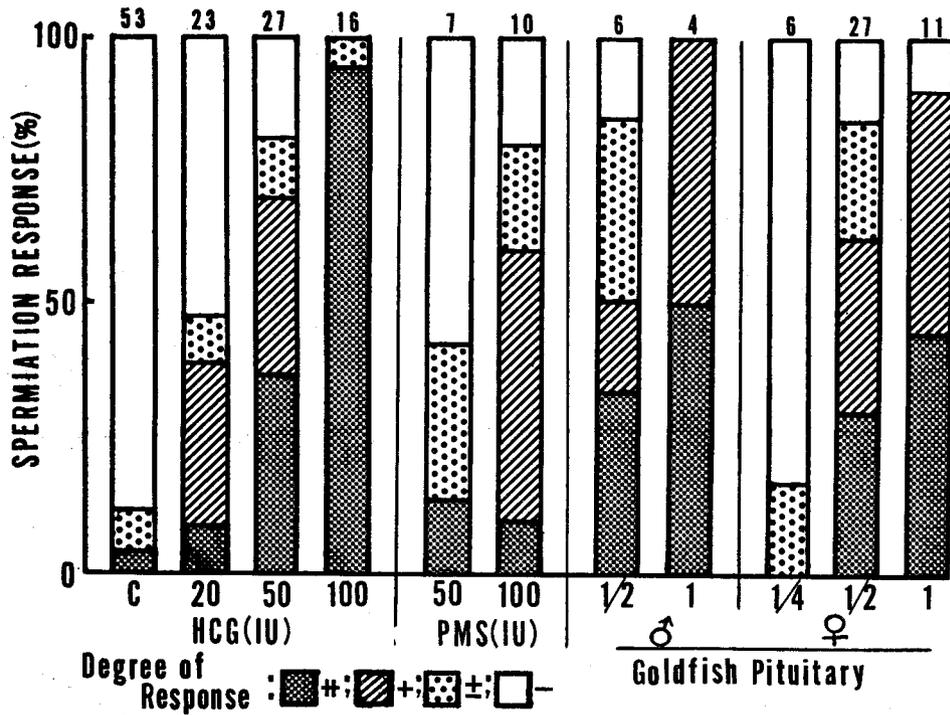
このように低水温において精巣の発達を抑制したキンギョを 20~23°C の水温に移しかつ飢餓の状態におくと、処理魚は多量の成熟精子をもつ完熟に似た状態の精巣をもつに至るとともに、泌尿生殖孔の上部を圧しても排精を示さなくなることがわかった。この排精の停止を“精巣完熟”の指標として、1970 年 3 月~7 月および 1971 年 8 月, 9 月に延べ 190 尾のキンギョ (体長 4.3~7.2 cm, 体重 3.7~14.5 g) を 20~23°C で絶食状態におき排精の停止を確かめた後本実験に用いた。3 月, 4 月お



Text-fig. 4. Changes in the hemi-gonosomatic indices (hGSI) of hemicastrated goldfish starved completely for 15-60 days in December, January and May. Numerals affixed to each line in the figure indicate the individual number of each fish. The values on each 0 days represent those of the left testes removed at the start, and those on other days those of the remaining right testes examined on those days. The mark, o, shows the hGSI of the right testis of sham-operated fish starved for 30 days in January.

よび5月の一部の実験に用いたキンギョについては飢餓処置開始時に左側精巣除去を行ない、実験開始時の精巣の状態の確認を行なった。排精の停止は3月には処理開始後35~42日目、4~7月には12~16日目、8~9月には9~15日目に明らかとなった。

同一種同一濃度のGTH投与の結果には群による有意な差がみられなかったので実験結果は投与物質ごと一括してText-fig. 5に示した。対照としての生理食塩水投与ではわずか11%に±以上の排精を認めたにすぎなかったが、20, 50および100IUのHCG投与は24時間後にそれぞれ39, 70, 94%の試験魚に明らかな排精反応を惹起した。また++の反応の出現率は、対照群では4%弱であったがHCG群ではそれぞれ9, 37, 94%と投与量にほぼ比例した増加をみせた。50および100IU



Text-fig. 5. Spermiation response of starved goldfish administered with various doses of HCG, PMS and goldfish pituitary homogenates. Numerals on top of each column indicate the number of assay fish used, and those below the bottom show the dose of the samples administered. The mark, C, means the groups of control fish injected with saline only.

の PMS 投与の場合には ± 以上の反応の出現率はそれぞれ 43, 80% と投与量が大きいかほど反応尾数が増す傾向を示したが, ++ 反応を示した割合はそれぞれ 14, 10% であって, HCG 投与の場合とは異なることが確かめられた。

また HCG 50 IU の 1 回投与により ++ の反応を示した個体は 3 月では 7 日, 5 月では 14 日, 7 月では 13 日後に再び排精の停止をみせ, これらに対する HCG の投与は上記したと同様な濃度に依存する排精反応の出現をみせた。HCG 単一注射後の排精効果の持続およびその期間の時期による差が何に基づくかは目下のところ明らかではないが, 魷魚を用いてのこの GTH 効果の生物試験は最初の排精停止後少なくとも 2 回の反覆が可能であると思われる。

魷魚の排精反応が魚類の下垂体性 GTH によっても同様な投与量への依存を示すかどうかを検討するために, 1970 年, 1 月および 5~7 月に計 27 尾の成熟雌キンギョ (体長 4.7~8.2 cm, 体重 3.6~22.0 g) および計 7 尾の成熟雄キンギョ (体長 5.9~7.1 cm, 体重 7.1~13.7 g) の脳下垂体をアセトン乾燥したものを雌雄ごとにまとめ, 注射直前に 0.6% 生理食塩水 0.2 ml あたり脳下垂体の 1/4, 1/2 または 1 個分を含むように懸濁させ, 上記と同様な方法でその排精誘導効果を調べた (Text-fig. 5)。雌キンギョの脳下垂体 1/4 個分の投与は 17% の試験魚に ± の反応を起こさせたのみであったが, 1/2 個および 1 個分では + 以上の反応がそれぞれ 63% および 91% の割合でみられ, HCG の場合と

同じく GTH 濃度が高いほど反応が強まった。同様な傾向は雄の脳下垂体投与の結果にもうかがわれた。雌雄とも脳下垂体 1 個分のもつ排精誘導効果は HCG 50 IU の示すそれを上まわっていた。また雄脳下垂体の試験例数が少ないため確実とはいえないが、脳下垂体の GTH 活性の雌雄差は認めることができなかった。

### 考 察

生殖腺にみられる反応を対象とする GTH 検定に望ましい条件としては、検定動物の生殖腺の状態に個体差がなく、しかも常に同様な状態にあること、従って任意の時期に試験を行ないうること、適当数の均一な状態の検定動物をそろえることが容易なこと、および外因性の GTH の効果を確実にとらえるために検定動物自体のもつ GTH の効果を無視できる状態におくことなどがあげられる。GTH の種属特異性を考慮して魚類を検定動物に使った GTH の生物検定法は、これまでいくつか報告されているが、いずれも処理や測定の方法などに GTH の一般的な生物試験法としての難点をもつ。たとえば未熟なニジマスに対する GTH 投与による精巣重量の増加をみる Robertson & Rinfret (1957) や Schmidt *et al.* (1965) の方法は、結果をうるのに長時間を要する欠点がある。コイ、キンギョ、またはニジマスを用いて GTH 投与後の精巣や精液の水分含量の増加をみる Clemens & Grant (1964, 1965) の方法は、検定魚の初期状態によって結果に差を生じやすく、また測定法がやや煩雑なきらいがある。近年、Yamazaki & Donaldson (1968 a, b) は下垂体を摘除した成熟雄キンギョにマスノスケ *Oncorhynchus tshawytscha* より抽出した GTH を投与し、結果として起こる排精反応が投与 GTH の量に依存することを確認し、新たな GTH の生物検定法として推している。この方法は下垂体摘除によって内因性の GTH を無視できる点や結果の判定が容易である点などに利点をもつが、完全に脳下垂体を摘除した適当な熟度の検定魚を多数そろえるという手法上の困難さを伴う。

内因性の GTH を消失させる手段としては、外科的除去以外に生理的にその分泌を抑える方法もある。Clemens & Reed (1967) はキンギョ雄への投餌量を初期体重の 1% に制限して、慢性飢餓の状態においた場合、処理魚の精巣は当初の 2~3 週間で少数の精原細胞と多量の成熟精子を含む精巣小嚢をもつようになり (complete maturity stage)、次いで精子の減少と小嚢腔の縮少をみせ (degeneration or sperm elimination stage)、約 4 ヶ月後には少数の生殖細胞がほとんど内腔を欠く肥厚した結合織の壁中にみられるのみの、きわめて退行した状態 (regressed stage) になることを示した。彼らはこのような精巣の変化が脳下垂体摘除後にみられるそれとよく一致することを指摘し、同様な餌料制限を受けたキンギョの脳下垂体での好塩基性細胞の減数 (Bogenschutz & Clemens, 1967 a)、脳下垂体蛋白の電気泳動における二、三分画の消失と精巣水分含量増加能からみた脳下垂体 GTH 活性の低下 (Bogenschutz & Clemens, 1967 b) とを併せて、長期間の飢餓が GTH に関して *pseudo-hypophysectomy* の状態をもたらすと結論している。

本研究では最も容易かつ確実な方法として餌料制限にかえて完全絶食を選んだが、処理キンギョの精巣にみられる変化は上記 Clemens らの観察とよく一致した過程をたどった。実験開始時の状態を可能な限り一定にするためにあらかじめ低水温に飼育して精子形成の進行をおくらせたキンギョを、より高い水温の実験水槽にうつすと精子形成は強く促進された。このような現象はメダカ *Oryzias latipes* の精子形成速度が水温 15°C よりも 25°C において顕著に早められるという Egami & Hyodo-Taguchi (1967) の知見や、キンギョの排精現象が飼育水温に支配されるという山本ら (1966) の報告にも示されている。本研究の結果から、水温上昇が精原細胞の分裂から精子変態に至る精子形成の全ての過程を一様に促進することが示唆されたが、飢餓処置の初期にみられる精巣成熟の促進もこのような温度効果によるものであろう。Clemens & Reed (1967) の場合も実験魚を池から 26°C の水温へ移しているため、同様な水温上昇の影響を考えてよかろう。

硬骨魚雄の脳下垂体除去は、一般的には第2次精原細胞の第1精母細胞への移行と精原細胞の分裂とを妨げる (Dodd & Wiebe, 1968)。Poecilia reticulata では脳下垂体摘除によって精原細胞の分裂増殖およびその精母細胞への移行が停止するが、手術時にあった精母細胞や精子細胞の精子への成熟は抑えられない (Pandey, 1969)。同様な事実は Pleuronectes platessa (Barr, 1963) やキンギョ (Yamazaki & Donaldson, 1968 a, b) でも知られている。本研究での飢餓処置は比較的短期間で脳下垂体の GTH の放出か産生、またはその双方を抑制し、結果として精原細胞の分裂の停止がおこり、処置当初の水温上昇により急速に減数分裂前期以後の過程に入った生殖細胞はそのまま成熟を続けて精子となり、結果として少数の精原細胞と多量の成熟精子をもつ精巣を生じたものと思われる。餌料制限が精原細胞の増殖を阻止することは上述の Clemens & Reed (1967) もすでに指摘しているところである。しかし、一見完熟に似たこの精巣の状態は、産卵期の生理的成熟とは異った GTH 欠除に伴う精巣退縮の初期像としてとらえるのが妥当であろう。

さらに飢餓魚の精巣が、このような“完熟”の状態に達するとともに、腹部圧迫によっても排精をみせなくなることが知られた。サメの類でも、ある期間の飢餓により放精が停止し、HCG または大量の泌乳刺激ホルモンの投与によって回復するという報告がある (Carlisle, 1954)。キンギョの排精もまた下垂体摘除後すみやかに停止し GTH の投与によって回復することから、明らかに GTH の支配下にある現象とされる (Yamazaki & Yamamoto, 1967; Yamazaki & Donaldson 1968a, b)。従って飢餓魚の排精停止は、内因性 GTH の作用を無視しうる状態、すなわち生理的下垂体摘除の状態を意味するものと考えうる。本研究ではこの知見に基づいて、排精停止をみせはじめた飢餓魚が“完熟”精巣をもち、外因性 GTH による排精誘導に反応しうる組織学的要素をもつものと判定した。このような飢餓魚への HCG の投与により明らかに排精が誘導され、しかも排精をみせる個体の比率は HCG 投与量に応じて高まることが確かめられた。さらにより明確な排精反応(++)をみせる個体の比率を目標とすると、この傾向はさらに顕著であった。またキンギョの脳下垂体を投与した場合にも同様に、投与量に依存する排精反応を、試験魚1尾あたり脳下垂体1個分以下の範囲内でみせたことは、飢餓魚を用いての GTH の量的検定の有用性を示すものと考ええる。PMS 投与の結果は例数が十分でないので断定し難いが、この場合の陽性の反応は必ずしも投与量と平行せず、PMS 中の LH 様作用物質の混在によるのかもしれない。しかし Yamazaki & Donaldson (1968 a) による脳下垂体摘除キンギョでは HCG は排精誘導に有効だが FSH または LH は無効であるとされているので、この PMS の効果については今後一層の検討を要する。

本研究の飢餓処置が魚に全身的な影響をおよぼすことは当然考えねばならない。飢餓によって退縮した精巣が外因性 GTH に対する反応性を失わないことは Robertson (1958) や Clemens & Reed (1967) によっても確かめられているが、排精誘導に有効な HCG の濃度からすると、本研究の結果は Yamazaki & Donaldson (1968 a) のそれに比して閾値が若干高く、反応性の低下が疑われる。これを考慮に入れても、飢餓魚による GTH 検定法はほとんど均一な状態の精巣をもつ多数個体を周年的に、かつ容易に用いることができる点で有利といえよう。

本研究の結果からして、外因性 GTH への反応の度合には季節差がないように思われるが、上述の“完熟”状態に達するまでの日数は、1月には30~45日、5月には15日と差をみせた。慢性飢餓状態にあるキンギョの GSI の変化や、飢餓よりの回復の過程が光と関連した季節差をみせることは Bogenschütz & Clemens (1967 a, b) が示唆しているが、本研究では、低水温飼育中のキンギョの生理的条件に差の原因を求めることが妥当のように思われる。たとえば飢餓処置開始時の精巣および内臓諸器官の周囲の脂肪組織の量は5月よりも12、1月にきわめて顕著で、これが飢餓効果の発現をおくらせる一因とも考えられる。また本研究での低水温飼育は地下水の揚水を利用したため、夏季にむかっただけの水温上昇はさけられず、従って5月の実験初期の精巣は冬季のものに比して若干進んだ熟度を示していた。このような実験開始期の精巣熟度の差も飢餓効果の発現速度に影響をおよぼすと思われ

る。飢餓効果の時期によるこのような差を最小限にとどめることも今後の課題の一つであろう。さらには、検定物質の投与量の体重あたりの換算および排精反応のより適確な評価の方法などについても、検定結果の個体差をより小にする方法として検討を重ねられるべき問題である。

飢餓処置開始時の精巣の状態の均一化をはかるために行なった片側精巣摘除は、本研究の目標としたGTH検定には必要な処置ではない。しかし処置開始時にきわめて未熟な精巣をもつ魚は飢餓処置による精巣の“完熟”化を期待できないことがわかったので、精巣の初期状態の均一性を確認するための生検は望ましい手段と思われる。片側精巣摘除群のGSIは投餌、飢餓いずれの処置においても偽手術群のそれに比して有意に大であって、残存精巣の補償肥大現象がキンギョでもみられることを確認できた。同様な現象は *Salmo gairdnerii* 雄 (Robertson, 1958) や *Heteropneustes fossilis* 雌 (Goswami & Sundararaj, 1967) でも報告されている。特に後者では、残存卵巣の補償肥大が卵原細胞の増殖と卵母細胞の肥大の双方に基づくものであることが明らかにされているが、本研究でも精巣の補償肥大が精原細胞の増殖を含む精子形成の全ての過程が均一に刺激促進された結果であることがうかがわれた。このような補償肥大現象が、哺乳類の幼雄の片側精巣除去後にみられるものと同じく生殖腺ホルモンの血中濃度低下に伴うGTHの分泌増加に起因するとすれば (Davidson, 1966, 参照)、この現象は魚類の脳下垂体-生殖腺系の機能相関の解析に1つの手がかりを与えるものであろう。これらの問題については現在もさらに研究を進めている。

#### 要 約

1. 水温 7~14°C で飼育してきた成熟途上の雄キンギョ, *Carassius auratus*, を12月, 1月および5月に、片側精巣摘除手術またはその偽手術を施し水温 20~23°C の実験水槽に移して15~60日間絶食させた群と普通に投餌した群とについて、片側生殖腺の重量指数 (hGSI) や精巣の組織所見にみられる変化を観察した。

2. 投餌群精巣の精子形成は水温上昇によって明らかに促進された。さらに片側精巣除去群の術後30日目の残存精巣のhGSIは偽手術群のそれに比して顕著に大であった。この補償肥大の現象は、残存精巣内の精原細胞の増殖を含む精子形成の全ての過程が一様に促進された結果であることが確かめられた。絶食群では、処理の初期に投餌群におけると同様な精子形成促進がみられ、また片側精巣摘除による残存精巣の補償肥大も認められたが、処理開始後45日(12月), 30日(1月), 15日(5月)には、精巣は少数の精原細胞と多量の成熟精子をもつ小囊より構成される完熟に似た状態を呈するとともに腹部圧迫による排精をみせない状態となった。さらに長期間の飢餓処置は精巣の明らかな退縮を導いた。

3. この完熟に似た状態の精巣をもち、かつ排精の停止をみせた飢餓魚にHCG 20~100 IUを腹腔内注射したところ、24時間後にみられる排精反応の強さはその投与量に依存して増大することが確かめられた。HCG 100 IUの投与はほとんど100%の個体に顕著な排精反応を誘起した。また雌雄キンギョの脳下垂体のアセトン乾燥物を1尾あたり1/4~1個投与した場合にも同様な濃度依存の傾向をみせる排精反応がおこった。脳下垂体1個分の投与による排精反応の度合はHCG 50 IU強に相当しており、また雌雄による結果の差は認められなかった。PMS 50, 100 IUの投与はわずかな反応を惹起したが、反応の度合の濃度依存性は明らかでなかった。これらの結果から、魚類の性腺刺激ホルモンの定量化の一方法として、飢餓キンギョの排精誘導効果を利用できることが確かめられた。

#### 文 献

- Barr, W.A. (1963). The endocrine control of the sexual cycle in the plaice, *Pleuronectes platessa* (L). III. The endocrine control of spermatogenesis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 3, 216-225.

- & Hobson, B.M. (1964). Endocrine control of the sexual cycle in the plaice, *Pleuronectes platessa* L. IV. Gonadotropic activity of the pituitary gland. *Gen. Comp. Endocrinol.* 4, 608-613.
- Blanc, N. & Abraham, M. (1968). Evaluation du pouvoir gonadotrope dans l'hypophyse de *Cyprinus carpio* et *Mugil cephalus*. *C.R. Acad. Sc. Paris* 267, 958-961.
- Bogenschütz, R.P. & Clemens, H.P. (1967a). Changes in the pituitary gland of goldfish, *Carassius auratus*, during diet-controlled gonadal regression. *Copeia* 1967, No. 4, 827-835.
- & —— (1967 b). Protein patterns of the pituitary gland of goldfish, *Carassius auratus*, during dietary controlled gonadal regression. *Comp. Biochem. Physiol.* 22, 157-167.
- Carlisle, D.B. (1954). The effect of mammalian lactogenic hormone on lower chordates. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 33, 65-68.
- Clemens, H.P. & Grant, F.B. (1964). Gonadal hydration of carp (*Cyprinus carpio*) and goldfish (*Carassius auratus*) after injections of pituitary extracts. *Zoologica* 49, 193-210.
- & —— (1965). The seminal thinning response of carp (*Cyprinus carpio*) and rainbow trout (*Salmo gairdnerii*) after injections of pituitary extracts. *Copeia* 1965, No. 2, 174-177.
- & Reed, C.A. (1967). Testicular characteristics of goldfish *Carassius auratus*, in nature and under diet limitations. *J. Morph.* 122, 131-138.
- Davidson, J.M. (1966). Control of gonadotropin secretion in the male. *Neuroendocrinology* (ed. L. Martini & W.F. Ganong), Academic Press, New York & London, I. [p. 565-609].
- Dodd, J.M. & Wiebe, J. P. (1968). Endocrine influences on spermatogenesis in cold-blooded vertebrates. *Arch. Anat. Histol. Embryol.* 51, 157-174.
- Egami, N. & Hyodo-Taguchi, Y. (1967). An autoradiographic examination of rate of spermatogenesis at different temperatures in the fish, *Oryzias latipes*. *Exp. Cell Res.* 47, 665-667.
- Fontaine, M. & Chauvel, M. (1961). Evaluation du pouvoir gonadotrope de l'hypophyse des poissons téléostéens, et en particulier du *Salmo salar* L. à diverses étapes de son développement et de ses migrations. *C.R. Acad. Sc. Paris* 252, 822-825.
- Goswami, S.V. & Sundararaj, B.I. (1968). Compensatory hypertrophy of the remaining ovary after unilateral ovariectomy at various phases of the reproductive cycle of catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Gen. Comp. Endocrinol.* 11, 401-413.
- Hansen, I.B. (1931). Gonadectomy in the goldfish *Carassius auratus*. *Science* 73, 293-295.
- Hoar, W.A. (1969). Reproduction. *Fish physiology* (ed. W.S. Hoar & D.J. Randall), Academic Press, New York and London, III, [p. 1-72].
- Pandey, S. (1969). Effects of hypophysectomy on the testis and secondary sex characters of the adult guppy *Poecilia reticulata* Peters. *Can. J. Zool.* 47, 775-781.
- Pickford, G.E. & Atz, J.W. (1957). *The physiology of the pituitary gland of fishes*. N.Y. Zool. Soc., New York. 613p.
- Robertson, O.H. (1958). Accelerated development of testis after unilateral gonadectomy, with observations on the normal testes of rainbow trout. *Fishery Bull. U.S. Fish. Wildl. Serv.* 127, 9-30.
- & Rinfret, A.P. (1957). Maturation of the infantile testes in rainbow trout (*Salmo gairdnerii*) produced by salmon pituitary gonadotropins administered in cholesterol pellets. *Endocrinology* 60, 559-562.
- Sage, M. & Bromage, N.R. (1970). The activity of the pituitary cells of the teleost *Poecilia* during the gestation cycle and the control of the gonadotropic cells. *Gen. Comp. Endocrinol.* 14, 127-136.
- Schmidt, P.J., Mitchell, B.S., Smith, M. & Tsuyuki, H. (1965). Pituitary hormones of the Pacific salmon. I. Response of gonads in immature trout (*Salmo gairdnerii*)

to extracts of pituitary glands from adult Pacific salmon (*Oncorhynchus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 5, 197-206.

- 山本喜一郎・長浜嘉孝・山崎文雄. (1966). 金魚の周年採卵法について. 日本誌 32, 977-983.
- Yamamoto, K. & Yamazaki, F. (1967). Hormonal control of ovulation and spermiation in goldfish. *Gunma Symp. Endocrinol.* 4, 131-145.
- Yamazaki, F. & Donaldson, E.M. (1968 a). The spermiation of goldfish (*Carassius auratus*) as a bioassay for salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) gonadotropin. *Gen. Comp. Endocrinol.* 10, 383-391.
- & ————— (1968 b). The effects of partially purified salmon pituitary gonadotropin on spermatogenesis, vitellogenesis and ovulation in hypophysectomized goldfish (*Carassius auratus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 11, 292-299.

## Explanation of Plates

### PLATE I

All photomicrographs show sections through testes of the goldfish,  $\times 130$ .

Fig. 1. A testis of a fish at the start of experiment in December. A small amount of mature spermatozoa are present in the narrow lumina of the seminal lobules.

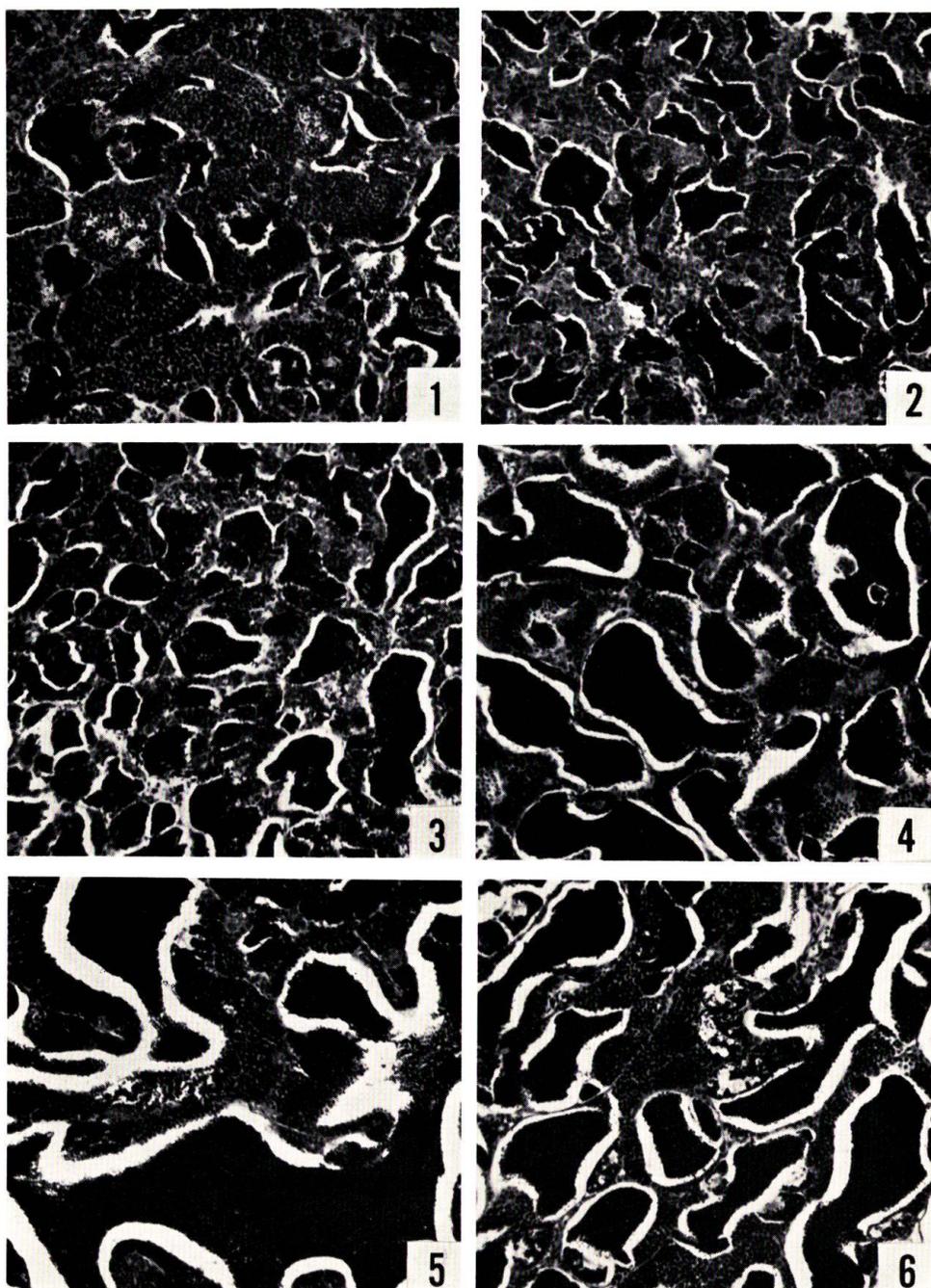
Fig. 2. A testis of a fish at the start of experiment in January. Seminal lobules contain a lot of cysts of spermatogonia.

Fig. 3. A testis of fish at the start of experiment in May. Spermatogenesis seemingly advanced but only slightly as compared with that of the winter months.

Fig. 4. A testis of a fish of the sham-operated and fed (ShC-F) group in January on 30th day of experiment.

Fig. 5. A testis of a fish of the hemicastrated and fed (HGx-F) group in January on 30th day of experiment.

Fig. 6. A testis of a fish of ShC-F group in May on 30th day of experiment.



Y. SASAYAMA & H. TAKAHASHI: Starvation of goldfish and GTH bioassay

## PLATE II

All photomicrographs show sections through testes of the goldfish,  $\times 130$ .

Fig. 7. A testis of a fish of the hemicastrated and fed (HGx-F) group in May on 30th day of experiment.

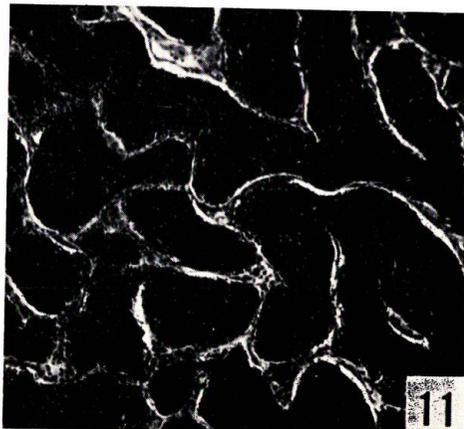
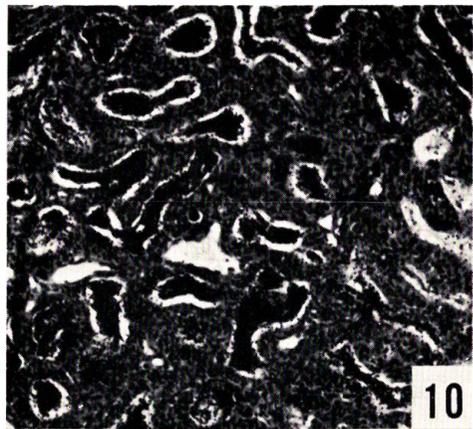
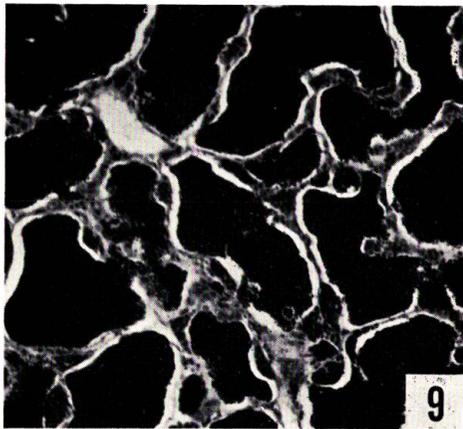
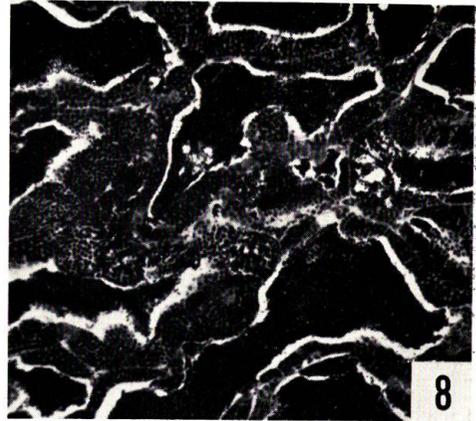
Fig. 8. A testis of a fish of the hemicastrated and starved (HGx-S) group in January on 15th day of experiment.

Fig. 9. A testis of a fish of HGx-S group in January on 30th day of experiment. Thinned lobule wall contains a few spermatocytes and spermatogonia.

Fig. 10. A testis of a fish of HGx-S group in January on 60th day of experiment. Note the diminished amount of spermatozoa in the lobule lumina accompanied by distinct shrinkage of the lobules.

Fig. 11. A testis of a fish of HGx-S group in December on 45th day of experiment. Seminal lobules are markedly expanded by accumulation of a large amount of spermatozoa in the lumen.

Fig. 12. A testis of a fish of HGx-S group in May on 15th day of experiment, indicating a state similar to full testicular maturation.



Y. SASAYAMA & H. TAKAHASHI: Starvation of goldfish and GTH bioassay