北大水産彙報
27 (1), 1–5. 1976.

Clomiphene citrate によるドジョウ (*Misgurnus anguillicaudatus*) の排卵促進について

上田　宏*・高橋裕哉*

Acceleration of Ovulation in the Loach, *Misgurnus anguillicaudatus*, by the Treatment with Clomiphene Citrate

Hiroshi UEDA* and Hiroya TAKAHASHI*

Abstract

Clomiphene citrate, an ovulation stimulator in mammalian animals, has been shown to be effective in inducing ovulation in a teleost, the goldfish. The present study demonstrated that the drug was also capable of accelerating ovulation in mature females of the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*, captured during their breeding period. Clomiphene citrate injected intraperitoneally into the fish at doses of 1 and 10 μg/g body weight every day brought about the onset of ovulation in some fish after the second injection, and successively induced a definite discharge of a large amount of mature eggs in all of the treated fish of both dosage groups after the fourth injection at latest, the response being relatively uniform in the 10 μg group. Injections of 0.6% saline only did not incite ovulation in any of the control fish throughout the period of treatment.

The ovulatory response to clomiphene citrate in the loach appeared, however, to be incomplete when tested at both dosage levels, resulting in the occurrence of higher ovarian weights after clomiphene-accelerated ovulation as compared with those measured on the fish after their natural spawning. At autopsy, a considerable amount of mature eggs was observed to remain unovulated mainly in the anterior region of the ovaries of the clomiphene-treated fish, the retention of unovulated eggs being more prominent in the fish of the 10 μg group than in those of the 1 μg group. The phenomenon was considered to reflect the fact that, in the natural condition, the maturation of ovarian oocytes in the loach progresses from the posterior and dorsal regions toward the anterior and ventral regions of the ovary. These findings seem to suggest that clomiphene citrate may act on the fish more mildly and physiologically, and thus may have a higher practical value for the artificial induction of ovulation than various pituitary preparations heretofore used in fish propagation.

魚類の排卵の人為的誘導には，従来魚類の脳下垂体抽出物など各種の脳下垂体製品の投与が広く用いられてきている。この方法はきわめて効果的ではあるが，投与量によって，また対象魚の成熟の度合によって，未熟卵の排出や卵の過熟化などがひきおこされ易い (Pickford & Atz[1] 参照)。またこの場合に最も有効とされる魚類脳下垂体の利用についても，新鮮な脳下垂体を大量に用意することが困難であるほか，その生殖腺刺激活性が魚の成熟度により異なること[2]，生殖腺刺激ホルモンに種特異性があること[3]，などの問題点がある。

* 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*)

Clomiphene は非ステロイド系の合成抗雌性ホルモン物質 (antiestrogen) としてヒトを含む哺乳類で排卵誘発に用いられているが，Pandey & Hoar[4] および Pandey et al.[5] はこの物質がキンギョ *Carassius auratus* でも排卵誘導作用をもつことを報告し，初めて硬骨魚の人為採卵に用いうる可能性を示唆した。また Breton et al.[6] は clomiphene がコイ *Cyprinus carpio* でも脳下垂体より生殖腺刺激ホルモンの大量放出を導くことを明らかにしている。魚類の人為的な排卵誘導にそれ自体の脳下垂体の機能昂進を利用すること，およびそれに clomiphene などの化学合成品を用いることは，上述した脳下垂体処理における難点の多くを消去するものといえようし，水産増養殖の実際面でも大きな価値を有するにいたる可能性が大である。このような見地から，本研究においては産卵期の成熟ドジョウ *Misgurnus anguillicaudatus* 雌を用いて，clomiphene citrate による排卵の誘導を試み，その効果の硬骨魚における普遍性を検討した。

稿をすすめるにあたり，北海道南部の野外におけるドジョウの成熟について種々の資料の御教示をいただいた北海道大学大学院水産学研究科尹泰憲氏にあつく御礼申しあげる。また本研究に用いた clomiphene citrate の入手に際しての塩野義製薬株式会社の御好意に深甚なる謝意を表する。なお，本研究の一部は文部省科学研究費補助金によったことを附記する。

材料と方法

本実験に用いたドジョウ (*Misgurnus anguillicaudatus*) は 1975 年 6 月下旬に函館市近郊で採集し本学部飼育室内の水槽に収容して，実験開始時まで自然水温，自然光条件下で 1 日 1 回市販の養魚用飼料を与えて飼育したものである。実験は同年 7 月上旬に行なった。実験開始にあたり全長 15.5～18.4 cm，体重 21.0～33.5 g の成熟雌を各 5 尾の 3 群に分け，それぞれを別個の単独循環式ガラス水槽にいれ，うち 2 群を clomiphene 処理群，他の 1 群を対照群として用いた。実験期間中の水温および光は自然条件とし，投餌は行わなかった。またこの期間の水温変化は 17～22°C であった。

処理には clomiphene citrate の純末を 0.6% 食塩水に 0.01 ml あたり 1 および 10 μg となるように溶解したものを用いた。処理群のうち 1 群には処理魚の体重 1 g 当り 1 μg を，他の 1 群には 10 μg を 1 日 1 回午後に，MS 222 により軽く麻酔した魚の腹腔内に注射し，翌朝腹部を軽く圧して排卵の有無を検した。充分な排卵がみられぬ個体には同様の処理を継続して行なった。また対照群には，体重 1 g あたり 0.01 ml の 0.6% 食塩水を腹腔内に注射した。充分な排卵をみせた処理魚は体長，体重を計測した後断頭屠殺し，生殖腺を摘出計重後 Bouin-Hollande 液で固定，8 μ の連続切片とし，Delafield's hematoxylin および eosin の 2 重染色を施して組織学的観察を行なった。対照群は実験開始の 4 日後に屠殺して比較観察に供した。

実験結果および考察

成熟雌ドジョウの clomiphene 処理の結果を要約して表 1 に示した。5 日間にわたる実験期間中，生理食塩水のみの注射をうけた対照群の 5 尾はいづれも排卵の徴候を全くみせなかった。しかし clomiphene 処理群では，初回注射の翌日には 1 μg 群および 10 μg 群のいづれにおいても排卵個体はなかったが，第 2 回注射の翌日には両群のそれぞれ 2 尾が腹部の軽い圧迫によりおよそ 30～50 個の卵を排出し，排卵が既に開始されたことを示した。第 3 回注射の翌日の検査では，clomiphene 1 μg 群ではこれらの 2 尾を含む 3 尾が，また 10 μg 群では処理をうけた 5 尾の全てが大量の卵を放出することが確かめられた。また clomiphene 1 μg 群ののこりの 2 尾は 3 回の注射では少量の卵の排出をみせるのみであったが，第 4 回注射の翌日には他個体と同様，大量の排卵をみせた。排卵された卵は，ほとんどが透明度の高い外観上正常な熟卵であった。受精試験は行わなかったが，これらの卵は淡水硬骨魚用生理食塩水中で付活されて明らかな囲卵腔形成をみせた。

各群の尾数が5尾にすぎずやや例数に乏しいきらいはあるが，対照個体が全く排卵をみせなかったのに対し clomiphene 処理個体のすべてが顕著な排卵をみせたことから，clomiphene がドジョウにおいて明らかな排卵誘発効果をもつと結論してよいように思われる。Clomiphene は非ステロイド系合成雌性ホルモンの chlorotrianisene と化学的に類似した物質で，クエン酸塩の形で 1961 年頃より無排卵症における排卵誘発剤として臨床的に用いられてきている。Clomiphene が硬骨魚類においても同様な効果をもつことは Pandey & Hoar[4] により初めて明らかにされた。彼らは 13～14°C の水温で排卵を抑えた成熟キンギョ *Carassius auratus* に体重 1 g あたり 1 および 10 μg の clomiphene を 1 日 1 回連続投与して，4 日目までに大多数の個体から受精可能な卵を得ることに成功した。Pandey et al.[5] は引き続き，この clomiphene による排卵誘導が処理魚の脳下垂体よりの生殖腺刺激ホルモン (GTH) 放出の促進の結果であることを報じた。最近 Breton et al.[6] は，キンギョで試みられたと同じ量の clomiphene がコイ *Cyprinus carpio* においても GTH の一過性の大量放出を惹起することを実証している。本研究においてドジョウに投与した clomiphene の量は，上記のキンギョおよびコイでの結果を参照して定めたものであって，魚体重 1 g あたり 1 ないし 10 μg の腹腔内注射は，ドジョウの排卵誘発にも充分有効であるし，さらに他魚種での排卵テストにも規準量として用いられ得るものと考えられる。

Table 1. *Results of treatment of mature female loach with different doses of clomiphene citrate.*

Treatment	No. of fish tested	No. of ovulating fish each day**				Mean body weight at autopsy (range) g	Mean gonad weight at autopsy (range) g	Mean GSI* (range)
		1	2	3	4			
Clomiphene 1 μg/g	5	0	(2)	3(2)	2	23.6 (20.0-30.1)	1.9 (1.2-3.0)	8.0 (6.0-11.2)
10 μg/g	5	0	(2)	5	0	25.4 (20.7-30.8)	2.6 (1.6-3.3)	10.3 (7.7-11.5)
—***	5	0	0	0	0	21.9 (19.5-25.6)	3.4 (2.8-4.4)	15.6 (13.5-18.8)

* GSI, gonosomatic index (gonad weight/body weight × 100).

** Numerals in parentheses indicate the number of fish displaying ovulation of a small amount of eggs.

*** Control fish were injected i.p. with 0.6% saline each day.

道南地方におけるドジョウの産卵期は 6 月から 8 月にかけてであるが，最盛期の 7 月に野外で採集された成熟未産卵雌の成熟度指数 (GSI，生殖腺重量/体重 ×100) は 13～15 であり，また産卵期後の 8, 9 月の個体の GSI は 4 前後であることが多い (尹，未発表)。表 1 にみられるように，本研究において実験終了時に屠殺した対照群の GSI は平均 15.6 であって，これらの卵巣が産卵期の高い成熟段階にあることは組織学的にも確められた。一方 clomiphene 処理群の GSI は，比較的均一な反応をみせた 10 μg 群で平均 10.3，反応の個体差のより大きかった 1 μg 群で平均 8.0 であった。これら処理個体の開腹時の所見では，卵巣前部に相当量の大型卵が残存しており，これが特に 10 μg 群の各個体に著しかった。組織学的にもこれらの卵巣内に残存する熟卵の数が自然産卵個体におけるよりも多かった。

ドジョウでは卵巣後部・背部の卵が前部・腹部のそれよりも早く成熟し[7]，また脳下垂体ホルモン処理による卵巣卵の成熟も卵巣後部より中部・前部へとすすむ[8] ことが知られており，clomiphene 処

理ドジョウにみられた卵巣の状態は，この卵巣卵の成熟進行の部位差を反映するもののように思われる。熟卵の残存が1μgによりも10μgにおいて大量であったことは，コイでのclomiphene投与が10μg/gよりも1μg/gでより一定したGTH放出を導くというBreton et al.[6]の報告にてらして興味ある現象であるが，ドジョウの排卵誘導において1μgがより有効であるか否かの判定は今後の検討にまたねばならない。10μgでは，排卵が1μgにおけるよりも早められる可能性があるし，また排卵をみせた個体にさらにclomiphene投与を継続することにより熟卵の完全な排卵を促しうるかもしれないからである。

ドジョウの排卵促進に同種の脳下垂体3ないし4個分の懸濁液を用いた場合，処理魚の成熟状態が良好であれば，28～30°Cの水温では腹腔内単一注射後13～14時間に排卵がみられるという[9]。これに比して本研究でのclomiphene処理の場合，排卵開始の最初の徴候は1μg，10μgの両群で第2回注射の翌日，即ち初回注射の2日後の検査で，また大量排卵が第3回注射ののちにみられ，また排卵反応は1μg群での個体差がより大であった。本研究での処理期間の水温が上記よりも低かったことも一因となりえようが，clomipheneが排卵に即効的ではないことはキンギョでも知られている[4]ので，これは内因性のGTH放出を介してなされるclomiphene誘導排卵の一般的傾向かもしれない。これに関連して興味がもたれるのは，コイに投与した1μg/gのclomipheneが単一注射後60時間前後に対照値の10倍をこえる著しいGTHの分泌を促したというBreton et al.[6]の報告である。もしドジョウに於てもclomipheneに対する反応がコイと同様であるとすれば，clomipheneの単一注射によっても，およそ3日後に排卵を導きうる可能性があろう。しかし，前述のように完全な排卵を導くためには，特にドジョウのように卵巣卵の成熟の進行が部位差をみせる場合には，本研究で用いたような反復注射が，より生理的な反応を起させるのに適切のように思われる。

脳下垂体抽出物ないし製剤による排卵刺激は，その投与量や対象魚の成熟の度合によって往々にして未熟卵の排出や過熟現象をともない易く[1]，ドジョウでの同処理もその例外ではない[9]。この点clomipheneの内因性GTHの放出刺激による排卵は，その進行が緩徐ではあるが生理的な排卵により近い状態のものと考えられる。Clomipheneの投与適量が魚種により異なるか否か，また対象魚成熟度の適切範囲がどの程度であるかなど，さらに検討を要する点はあるが，化学合成物であるclomipheneはその使用が簡便であり，GTHの種特異性[3]の問題もないので，将来clomiphene処理が魚類の採卵に従来の脳下垂体処理にかわるより好適な手段として用いられうる可能性が充分あろう。

なお，clomipheneの作用機序に関しては，この物質が適正少量では視床下部一脳下垂体レベルでの雌性ホルモンのnegative feedback効果によるGTH放出抑制を拮抗的に阻止するという抗雌性ホルモン作用により，脳下垂体よりGTH放出を誘発することが哺乳類で明らかにされており[10]，キンギョでの排卵刺激についても同様の機序が暗示されている[11]。Breton et al.[6]もコイでclomipheneの同様な効果を示唆しているが，彼らはclomipheneによるGTH放出が処理コイの性を問わず，またそれらの成熟度とも無関係にみとめられると述べている。このことは魚類におけるclomipheneの作用機序について若干の問題を提起するとともに魚類の種苗生産へのclomipheneの利用をすすめるうえにも充分考慮すべき点のように思われる。

要　　約

キンギョでしられているclomiphene citrateの排卵誘発効果を産卵期のドジョウ *Misgurnus anguillicaudatus* の成熟雌を用いて検討した。1μgおよび10μg/g体重のclomipheneを1日1回連日腹腔内に注射した場合，第3回注射ののちに明らかな排卵が導かれた。生理食塩水を同様にして投与した対照群には排卵が全くみとめられなかった。この排卵促進は1μg群に比して10μg群でより顕著であったが，卵巣内に未排卵の熟卵の残存もより著しかった。方法にさらに検討を加える必要はあろ

うが，clomiphene 処理は従来の脳下垂体処理にかわる方法として，硬骨魚の排卵の人為的促進に用いうる可能性が高いと思われる。

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) Barr, W.A. and Hobson, B.M. (1964). Endocrine control of the sexual cycle in the placie, *Pleuronectes platessa* (L.). IV. Gonaodotropic activity of the pituitary gland. *Gen. Comp. Endocrinol.* **4**, 608–613.
3) Breton, B., Billard, R. and Jalabert, B. (1973). Spécificité d'action et relations immunologiques des hormones gonadotropes de quelques téléostéens. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* **13**, 347–362.
4) Pandey, S. and Hoar, W.S. (1972). Induction of ovulation in goldfish by clomiphene citrate. *Can. J. Zool.* **50**, 1679–1680.
5) Pandey, S., Stacey, N. and Hoar, W.S. (1973). Mode of action of clomiphene citrate in inducing ovulation of goldfish. *Can. J. Zool.* **51**, 1315–1316.
6) Breton, B., Jalabert, B. and Fostier, A. (1975). Induction de decharges gonadotropes hypophysaires chez la Carpe (*Cyprinus carpio* L.) à l'aide du citrate de cisclomiphene. *Gen. Comp. Endocrinol.* **25**, 400–404.
7) 久保田善二郎 (1952). ドジョウ卵巣の成熟過程に就いて．第1報．天然産ドジョウの卵巣の成熟過程．農水研報 **2**, 35–39.
8) 藤田　正・宇野　寛・八柳健郎・久保田善二郎 (1948). 脳下垂体ホルモンに依るドジョウの採卵に就いて・日水誌 **13**, 254–258.
9) 小林　弘・山林　勇 (1957). ドジョウの放卵促進に及ぼす同種ドジョウの脳下垂体の影響．魚雑 **6**, 170–176.
10) Roy, S., Greenblatt, R.B. and Mahesh, V.B. (1964). Effects of clomiphene on the physiology of reproduction in the rat. II. Its oestrogenic and antioestrogenic actions. *Acta Endocrinol.* **47**, 657–668.
11) Pandey, S. and Stacey, N. (1975). Antiestrogenic action of clomiphene citrate in goldfish. *Can. J. Zool.* **53**, 102–103.