養殖雄ウナギの人為成熟に伴う視床下部脳下垂体系の形態変化^{*1}

山本喜一郎・春日清一・大森正明

(1973年11月2日受理)

Histological change of the hypothalamo-hypophyseal system of the Japanese eel during maturation induced by Synahorin injection

Kiichiro YAMAMOTO^{*2}, Seiichi KASUGA^{*2}

and Masaaki ŌMORI^{*2}

Hypothalamo-hypophyseal neurosecretory system and adeno-hypophysis of male Japanese eels, *Anguilla japonica*, transferred into sea water and induced to maturation by Synahorin injection were observed histologically. Transfer of the eels to sea water activated GTH-cells slightly, but spermatocytes were not observed in the testicular tissue. Lateral tuberal nucleus of eel injected with Synahorin was activated in correlation with an increase in GTH-cell activity and testicular maturation. The preoptico-hypophyseal neurosecretory system failed to show any recognizable changes during the maturation of treated eels.

山本ら¹⁾は先にシナホリン投与により養殖ウナギの精巢成熟に成功し、さらにこの際シナホリン投与を受けたウナギの生殖腺刺激ホルモン産生細胞 (GTH 細胞) が活性化することを報告した。²⁾ このことはシナホリン投与を行なつたウナギの精子形成は単に外因性の生殖腺刺激ホルモンにより誘起されるのではなく内因性の生殖腺刺激ホルモンが共に働くことにより引起されている可能性を示唆している。この際見られた GTH 細胞の活性化の現象は生殖腺刺激ホルモンが視床下部に作用しその機能を抑制する short feedback, あるいは性ステロイドが GTH 細胞の機能を抑制するいわゆる negative feedback のこれまでの概念では説明することができない。そこで今回は視床下部脳下垂体系の観察を行ないシナホリン投与による雄ウナギの人為成熟がどのような機構で行なわれるか考察した。

材料と方法

本研究に用いたウナギは 1971 年 10 月、函館市内の業者から購入した日本産ウナギ (*Anguilla japonica*) 60 尾で標本採集時の体長は 38.2-56.5 cm, 体重は 105-246 g であつた。これらのウナギは対照群および 4 種のホルモン投与群に分け、それぞれ約 80 l の水槽に収容し、自然光下、水温 $19 \pm 1^\circ\text{C}$ の下で保持された。実験期間中給餌は行なわなかつた。ウナギは淡水から 1/3・1/2・3/4 海水に移し、それらの海水中でそれぞれ 1 週間馴致した後、全海水に移行した。ホルモン投与は 1 回目を 1/2 海水移行の直前に行ない、以後 1 週間おきに計 6 回行なつた。注射に先だち魚は 1/4000 の MS-222 で麻酔した後、実験群では各群個体当たり、10, 25, 50, 100 家兎単位のシナホリン (帝国臓器) を 0.6% 食塩水 0.5 cc に溶かし背部筋肉内に注射した。対照群には 0.6% 食塩水のみを注射した。実験群、対照群ともにホルモン投与後 6 日目に概ね 2 尾づつを MS-222 で麻酔後断頭により屠殺し、脳および脳下垂体をハイデンハインのササ液にて固定し、パラフィン包埋

^{*1} 本研究の費用の一部は文部省科学研究費によつた。

^{*2} 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).

し厚さ 6-7 μ の連続切片とし、アルデヒドフクシン (AF) 染色、マロリーのアザン染色、デラフィルドのヘマトキシリン・フロキシン染色、およびチオニンによるニッスル染色を施し顕微鏡観察した。なお 60 個体中 11 個体は雌であつたので結果からは除外した。

観 察 結 果

精巢の成熟度 実験開始時の対照群および実験期間中に採集した対照群の精巢は精原細胞のみより成り精母細胞は観察されなかつたが、これら対照群のうち海水に移行したものの中に精原細胞が増加の傾向を示すものが見られた。またシナホリン投与群においては 10 家兎単位のものでも精子形成は進行して、最初の注射後 1 週目よりすでに精母細胞を観察することができた。投与量の違いによる成熟度の差は一応高単位のものの方が精巢重量が大きく、さらに投与回数が増すに従い成熟が進む傾向がみられた。精巢の詳しい観察は別に報告される予定である。

視束前核神経分泌細胞 視束前核は視束交叉前上方部に位置し、第 III 脳室を狭んで左右に対をなしている (Figs. 1, 2 および 3)、神経分泌細胞は一層の脳室上衣細胞の内側に群在し、前方は pars parvocellularis と呼ばれ、短径 15-25 μ の多数の小細胞よりなる。また背部後方には短径 20-30 μ の大型細胞群 pars magnocellularis が位置する。この 2 つの細胞群の境界は明確でなく、それぞれの細胞学的特徴も大きさを除いては差違が認め難い。この細胞の神経分泌物は AF に良く染まり、その軸索は神経性脳下垂体まで追うことができる。また反軸索側の突起はしばしば脳室上衣細胞の間を通して第 III 脳室に達している (Fig. 2)。AF 陽性物質は核周囲に多く細胞質周辺部には少ない。核はほぼ円形で中心に 1 つの仁を持つことが多い。ニッスル染色を施すとニッスル小体が細胞体の周辺に帽状に現われることが多く粗面小胞体の存在が暗示される。多くの個体で脳室上衣細胞中に AF 陽性のコロイド顆粒が認められた (Fig. 3)。視束前核は個体により神経分泌細胞の第 III 脳室への突起の様子、脳室上衣細胞内のコロイド顆粒などに違いが認められたが、これらの変化と魚の成熟との関連は見出し得なかつた。また神経分泌物の量も成熟期間を通して顕著な変化を示さなかつた。日本ウナギにおける視束前核の構造はヨーロッパウナギのそれと良く一致する。⁸⁾

隆起部外側核 隆起部外側核神経分泌ニューロンは汨斗窩前方に広く散在し、細胞群を作つて存在することは少なく、その数や位置は個体による変異が大きい (Figs. 4 および 5)。これらの細胞体は神経膠細胞や脳室上衣細胞より大きく明らかに後 2 者の細胞とは区別できる。細胞体の形は軸索以外の突起は少なくほぼ楕円形をしている (Fig. 6)。細胞質は AF 陰性でフロキシンに弱く染まり、軸索の末端は脳下垂体までたどることができる。核は大きく普通 1 つの仁を有する。細胞体の反軸索側にはニッスル小体が帽状に存在する (Fig. 8)。この細胞は海水移行のみでは顕著な変化を示さなかつたが、シナホリン投与により魚が成熟するに伴つて大きな変化を示すことが知られた。すなわち実験開始時の対照魚ではこの細胞体は短径 20 μ 以下で細胞質は少なく、ニッスル小体の発達は極めて悪い (Fig. 7)。核はほぼ円形で直径 10-15 μ 、仁は余り大きくない。しかるにシナホリン投与群では投与 1 回のもの 6 個体中 2 個体で神経分泌細胞の肥大の傾向が認められ、大きなものでは短径 23 μ 、核径 17 μ に達していた。さらにホルモン投与 2 週間以後のものでは細胞の肥大はさらに顕著で核直径は 15-25 μ となり、ある個体の細胞では大きな仁を含むほぼ円形の核を持ち良く発達したニッスル小体とフロキシン好性物質を含む細胞質が認められた (Fig. 8)。また時には不規則な形の肥大した核を有し殆んど細胞質の認められない細胞を有する個体もみられた (Fig. 9)。この細胞質の少ない隆起部外側核細胞を持つ個体は投与回数が増し、成熟の進んだものに多くなる傾向があつた。シナホリン投与 6 回目の個体に肥大した隆起部外側核神経分泌細胞が前部神経性下垂体中に侵入しているものが認められた (Fig. 10)。ホルモン投与量による差は投与量の多いものほどより明確な変化を示す傾向はあるが、今回の実験では使用個体数が少なくホルモンの投与量と本細胞の変化の相関を明らかにすることはできなかつた。

神経性脳下垂体 ウナギの神経性脳下垂体は前部と後部に分けることができ、前部は前腺性下垂体および中腺性下垂体と接し、視束前核を起源とする AF 陽性軸索は極くわずかに認められるのみで、フロキシン好性の細い神経繊維の侵入がみられ、この軸索はヘリング小体を形成することは殆んどない。後葉細胞は小形の細長い核を持ち散在する。後部神経性下垂体は後腺性下垂体内に深く侵入し、AF 陽性の神経分泌物質

を多量に貯蔵している。またフロキシン好性軸索の侵入も認められた。さらに後部神経性下垂体の中には第III脳室の突起が深く侵入しており、後葉細胞はこの腔を裏打ちする形で群在する (Fig. 11)。これら神経性下垂体は本実験の間、認め得るような組織学的変化は示さなかつた。

腺性脳下垂体 腺性脳下垂体についてはすでに山本と長浜²⁾により詳しく報告されたが、ここでは新たに明らかになった部分をつけ加える。中腺性下垂体のシナホリン投与によつて起る変化は GTH 細胞の活性化と成長ホルモン産生細胞の不活性化であるが、今回の実験においてはホルモン処理を行なわない海水移行のみの個体においても GTH 細胞の活性化が認められた。すなわち、実験開始時の対照魚の GTH 細胞は殆んど染色性を持たない 4-5 μ の小さな細胞であるが (Fig. 12), 1/2 海水移行後一週目のものでは細胞の幅は約 5 μ , 高さは 6-8 μ と少し大形となり細胞質の結合組織側に AF 陽性物質を集積していた。しかし成長ホルモン産生細胞の染色性の低下は認められなかつた。さらに高濃度の海水に移行したものでもほぼ同様の状態が続いた (Fig. 13)。シナホリン投与群では GTH 細胞は 1 回投与で細胞の幅は 5-6 μ , 高さ 8-10 μ となり (Fig. 14), 3 回投与群では幅 7-8 μ , 高さ 10-15 μ と著しく大形となり中腺性下垂体の半分以上を占めるようになった (Fig. 15)。染色性は一般に結合組織側に AF 陽性物質を貯えることが多いが、時には AF に対する染色性が弱く細胞質内に空胞の認められる場合 (Fig. 16) や, AF 陽性物質を反結合組織側に多く貯える場合 (Fig. 17) などがみられ GTH 細胞の生理状態も採集時期により可成り異なることを示している。

考 察

硬骨魚類の視床下部神経分泌系は視束前核および隆起部外側核の2つが知られているが⁴⁾この両者の GTH 細胞の支配についてはまだ解決されない点が多い。すなわち BILLENSTIEN⁵⁾により隆起部外側核が性成熟に伴つて顕著に変化することが報告されて以来、この神経分泌核が生殖に関与していることが多くの研究者により提唱された⁶⁻⁹⁾。しかしこの細胞群は性成熟に伴い顕著な変化を示さない例も報告されている¹⁰⁾。一方視束前核からの神経分泌軸索については、ヨーロッパウナギで中腺性下垂体への侵入が認められ、その神経分泌物質の量は銀化ウナギの方が若いウナギより多い事が報告された¹¹⁾。またメダカでは AF 陽性の神経分泌軸索が GTH 細胞の周囲に侵入し、視束前核神経分泌系が生殖周期に伴う変化を示す¹²⁾。日本産ウナギでは AF 陽性軸索の中腺性下垂体への侵入は少なく、AF 陰性軸索が主体でその多くは隆起部外側核の細胞からの軸索であることが認められた。さらに隆起部外側核が性成熟に伴つて顕著に変化するにもかかわらず視束前核の変化が認められなかつたことは、ウナギの性成熟には隆起部外側核が主要な役割を負っているように思われる。隆起部外側核の成熟に伴う肥大現象は降海したウナギでも認められている¹³⁾。この研究では GTH 細胞の支配中枢を決定することができなかつたが、外因性生殖腺刺激ホルモンが単に生殖腺を刺激するのみでなく、視床下部脳下垂体生殖腺系を共に活性化させることを明らかに出来た。ここで従来の feedback 機構、すなわち、GTH が性ホルモンの合性を刺激し、性ホルモンが視床下部又は GTH 細胞に働いてその機能を抑制する long loop feedback、または GTH が直接視床下部に働き、その機能を抑制する short loop feedback 機構では本実験でみられた外因性 GTH による視床下部—GTH 細胞系の活性化現象は説明できない。上記の negative feedback 現象は一般には成体における現象であるが本実験における結果は未熟な段階、すなわち視床下部脳下垂体生殖腺系の完成が十分でない段階から、その系の完成を経て性成熟に達する過程を考慮しなくてはならない。ある内分泌環の完成の段階では、例えば両生類の変態時における甲状腺ホルモンの急激な増加の必要性のため甲状腺ホルモンの視床下部に対する正の feedback 現象がみられることや、最近我々の研究室で明らかにされた性ステロイドが性的不活性時のメダカの GTH 細胞をある程度活性化する* など特殊な現象が認められる。これらのことから、ウナギの人工催熟の場合外因性 GTH により生殖腺が刺激され性ホルモンが分泌されそれが視床下部に働き視床下部—GTH 細胞系の活性化を促進させ、視床下部—脳下垂体—生殖腺環の完成が行なわれ得るものと推察される。この生殖系環の完成された段階においては、従来の negative feedback 機構が成立すると考えて良いであろう。従つてそれ以後の多量の

* 高野和則, 春日清一 (未発表)

外因性 GTH の投与は内因性 GTH の放出を抑制する可能性がある。しかしこの問題を明確にするには、本実験の場合と脳下垂体を摘除した場合の外因性ホルモンの催熟効果を比較する必要がある。本実験において GTH 細胞に GTH の放出を強く示唆するような像が認められている。今仮に活性化された GTH 細胞が GTH を放出する能力を有するとするならば、外因性 GTH の投与の直後は体内 GTH レベルが異常に高くなり、その為下垂体の GTH 細胞よりのホルモン分泌が抑制を受けるものと予想される。しかし 1 週間隔の次の投与までには外因性 GTH は代謝され体内における GTH レベルが低下していくであろうから、この際内因性ホルモンが放出され体内 GTH レベルをある段階に維持しようとするホメオスタシス機構が働く可能性がある。また今回の実験では海水に移行しただけで GTH 細胞が幾分活性化されたが、これは前回 6 月に行なわれた実験結果とは異なる²⁾。この原因は実験時期の季節的違い、主として日長の差による可能性が強い。このような生殖腺の季節的感受性の違いは佐藤ら¹⁴⁾によりすでに報告されており、未熟魚もまた不明瞭ではあるが成熟魚と相似た生殖周期をくり返しているものと推察される。

要 約

養殖雄ウナギの海水移行およびシナホリン投与による人為成熟の際の視床下部—脳下垂体系を組織学的に調べた結果を得た。

1. 視床前核神経分泌細胞では海水移行および人為成熟により顕著な変化が認められなかった。
2. 隆起部外側核神経分泌細胞はフロキシン好性で、シナホリン投与により生殖腺が成熟するに伴い肥大しそれと共に顕著な活性化の様相を示した。
3. ウナギの降河時に行なつた今回の実験では海水移行のみでも GTH 細胞のある程度の活性化がみられた。

文 献

- 1) 山本喜一郎, 広井 修, 平野 忠, 森岡孝朗: 本誌, **38**, 1083-1090 (1972).
- 2) 山本喜一郎, 長浜嘉孝: 同誌, **39**, 585-594 (1973).
- 3) J. F. LEATHERLAND and J. M. DODD: *Phil. Trans. R. Soc. B*, **256**, 135-145 (1969).
- 4) H. KOBAYASHI and T. MATSUI: in "Frontiers in Neuroendocrinology, 1969" (ed. by W. F. GANONG and L. MARTINI), Oxford Univ. Press, England, 1969, pp. 3-46.
- 5) D. C. BILLENSTIEN: *Gen. Comp. Endocrinol.*, **2**, 111-112 (1962).
- 6) Y. HONMA and E. TAMURA: 本誌, **31**, 878-887 (1965).
- 7) Y. HONMA and A. SUZUKI: *Jap. J. Ichth.*, **15**, 11-27 (1968).
- 8) R. E. PETER: *Gen. Comp. Endocrinol.*, **14**, 334-356 (1970).
- 9) D. ZAMBRANO: 同誌, **17**, 164-182 (1971).
- 10) E. TAMURA and Y. HONMA: 本誌, **35**, 875-884 (1969).
- 11) F. KNOWLES and L. VOLLRATH: *Phil. Trans. R. Soc. B*, **250**, 329-342 (1965).
- 12) S. KASUGA and H. TAKAHASHI: *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.* **21**, 259-268 (1971).
- 13) Y. HONMA: *La mer.*, **4**, 27-46 (1966).
- 14) 佐藤英雄, 中村中六, 日比谷 京: 本誌, **28**, 579-584 (1962).

Explanation of Plate I

- Fig. 1.** Sagittal section of the preoptic nucleus of the Japanese eel. PMC, pars magnocellularis; POR, preoptic recess; PPC, pars parvocellularis; AF. $\times 100$.
- Fig. 2.** Transversal section of the preoptic nucleus of the eel. Neurosecretory cells arranging under ependymal cells elongate their cytoplasm (arrows) to the third ventricle (III). AF. $\times 200$.
- Fig. 3.** Transversal section of the preoptic nucleus. Large AF positive colloid droplets (arrows) appear in the ependymal cells. AF. $\times 400$.
- Figs. 4. and 5.** Median sagittal sections through the pituitary gland and hypothalamus contiguous to the pituitary. IR, infundibular recess; MESO, meso-adenohypophysis; META, meta-adenohypophysis; NH, neurohypophysis; PRO, pro-adenohypophysis; SV, sacus vasculosus; T, tracts of the preoptico-hypophysial system; III, third ventricle. Fig. 5 indicates a highly magnified tract of preoptico-hypophysial system. Some neurosecretory cell bodies of the lateral tuberal nucleus (arrows) are seen. AF, Fig. 4, $\times 60$, Fig. 5, $\times 150$.
- Figs. 6-9.** Neurosecretory cells of the lateral tuberal nucleus observed through the process of this study. $\times 400$.
- Fig. 6, a neuron of the lateral tuberal neurosecretory cell. Thionine. Fig. 7, the cells of the untreated animal. Azan. Fig. 8, the cells of the male eel matured by Synahorin injection. Nissl bodies (arrows) are well developed. Thionine. Fig. 9, the cells bearing the large nucleus of irregular shape and scanty cytoplasm, which have been revealed in the fish injected 6 times of Synahorin. AF.

Explanation of Plate II

- Fig. 10.** Anterior neurohypophysis (left side) and Meso-adenohypophysial cells (MESO). Large neurosecretory cell (arrow) of the lateral tuberal nucleus is seen invading into the anterior neurohypophysis. Small pituicytes are scattered in the neurohypophysis. Thionine. $\times 200$.
- Fig. 11.** Posterior neurohypophysis of the eel. A cavity ramified from the third ventricle is found in the neurohypophysis (arrow) and pituicytes are lined around the cavity. Thionine. $\times 400$. BV, blood vessel.
- Figs. 12-17.** Some figures of the meso-adenohypophysis of male Japanese eels examined in this study. AF. $\times 400$.
- Fig. 12, untreated initial control fish. STH-cells are stained with orange G but GTH-cells are unstainable. Fig. 13, meso-adenohypophysis of the eel reared in sea water for 6 weeks. GTH-cells are slightly stained with AF and STH-cells kept a good stainability to orange G. Fig. 14, the animal sacrificed at 6 days after first injection of 50 RU Synahorin. GTH-cells are activated well and AF positive materials are concentrated in the connective tissue side of the cells. Fig. 15, a specimen sampled at 3 weeks after initiation of the Synahorin injection (50 RU). GTH-cells are hypertrophied and occupied a large part of the meso-adenohypophysis. Fig. 16, a specimen treated with 10 RU Synahorin for three weeks. GTH-cells are numerous but its affinity to AF stain is weak and some vacuoles are found included in the cytoplasm of the cells. Fig. 17, a specimen treated with 50 RU Synahorin for three weeks. GTH-cells are alined on expanded blood vessel (BV) and AF-positive material is not recognizable in their cytoplasm of blood vessel side.

Plate I.

Plate II.