合成 LH-放出ホルモンによるマコガレイおよびマハゼ の排卵誘発について

会田 勝美・Robert S. IZUMO

佐藤 英雄・日比谷 京

(1977 年 11 月 16 日受理)

Induction of Ovulation in Plaice and Goby with Synthetic LH-Releasing Hormone

Katsumi AIDA^{*1}, Robert S. IZUMO^{*1}, Hideo SATOH^{*2},
and Takashi HIRIYA^{*1}

This investigation was carried out to clarify the effect of synthetic LH-Releasing Hormone (LH-RH) on induction of ovulation in plaice, *Limanda yokohamae*, and goby, *Acanthogobius flavimanus*. Thirty seven mature female plaice weighing 123-291 g (average 189 g) were used in two experiments. In the first experiment, it was ascertained that 1 mg LH-RH dissolved in 0.2 ml physiological salt solution could not induce ovulation, whereas 1 mg LH-RH emulsified with complete adjuvant caused immediate increase in body weight and induced ovulation in all treated fish. A subsequent experiment was undertaken to discern the optimum dosage and sustaining effect of a single intramuscular injection of emulsified LH-RH. LH-RH at a dosage of 1 mg induced ovulation in all fish (average 4.2 days); 200 µg resulted in ovulation in 4 of 5 fish (average 6.75 days); while 40 µg had the same effect in only 2 of 5 fish (average 8.5 days). In the third experiment, 80 mature female goby weighing 32-76.5 g (average 46.9 g) were used. Emulsified 100 and 350 µg LH-RH induced ovulation in 11 of 20 fish and in all fish, respectively. An aqueous solution of LH-RH 100 µg induced ovulation in only 1 of 10 fish. Therefore, it is concluded that synthetic LH-RH can induce ovulation, and moreover, a LH-RH emulsion is more effective than an aqueous solution in inducing ovulation due to prolonged absorption.

近年, SCHALLY ら¹⁻⁴⁾によつてブタ視床下部から LH-放出ホルモン (LH-RH) が単離され, その構造が明らかにされて, 合成も可能となつた。哺乳類ではこの合成 LH-RH を用いて多くの実験がなされ, LH, FSH 放出の様相がしだいに明らかにされてきた。魚類でも LH-RH が血液中のゴナドトロピン量を増加させることが BRETON ら⁵⁾や, CRIM ら⁶⁾によつて報告されている。また, アユ⁷⁾およびキンギョ^{8,9)}では LH-RH 水溶液が排卵を誘発するという報告がある。しかし魚類における卵黄蓄積, 排卵, 産卵などに対する効果についてはまだ十分な知見が得られていない。そこで今回は, まず LH-RH の排卵誘発効果, 有効投与量および投与方法などについてマコガレイおよびマハゼを材料として検討を行なつたのでその結果を報告する。

材料および方法

実験は 1974 年 12 月から 1975 年 3 月にかけて, 東京大学農学部附属水産実験所(静岡県舞阪町)において行なつた。材料には浜名湖で漁獲された体重 123~291 g (平均 189 g) のマコガレイの成熟雌魚 37 尾, および渥美養魚株式会社より入手した体重 32~76.5 g (平均 46.9 g) のマハゼ成熟雌魚 80 尾を選び, 数日間蓄養後, 実験に供した。

実験 1 (マコガレイ) 0.2 ml の生理食塩水に溶解した LH-RH (武田薬品工業(株)製) 1 mg 投与群 (9 尾) および同量の溶媒のみを投与する対照群 (8 尾) の 2 群を設け, 3 日間隔で 2 回筋注により投与, 6 日目にこれら 2 群を, さらにそれぞれ LH-RH 1 mg を含む 0.2 ml の乳化液投与群と乳化した溶媒のみを投与する対照群とに分け, 6, 9 日目に筋注により投与し, 排卵誘発効果

^{*1} 東京大学農学部 (Lab. Fish Physiology, Fac. Agr., University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo)

^{*2} 東京大学農学部附属水産実験所 (Fisheries Lab., Fac. Agr., University of Tokyo, Maisaka-cho, Hamana-gun, Shizuoka-ken)

を調べた。なお乳化液は、LH-RH を溶解した生理食塩水に等量の Freund complete adjuvant あるいは incomplete adjuvant (IATRON LAB.) を加えた後、十分混和して作製した。

実験 2 (マコガレイ) LH-RH 1 mg, 200 μ g および 40 μ g を含む 0.2 ml の乳化液投与群、および乳化した溶媒のみを投与する対照群の 4 群 (各群 5 尾) を設け、筋注により 1 回投与し、有効投与量、効果持続時間の検討を行った。

実験 3 (マハゼ) Table 3 に示した 8 群を設け、実験開始時、および 48 時間後の 2 回、腹腔内 (0.2 ml 水溶液) あるいは筋注 (0.2 ml 乳化液) によつて各ホルモン剤を投与し、排卵誘発効果を比較した。

実験は海水を流水状態にした 2 m² の水槽で行なつた。また、全魚体につき、毎日定時に麻酔せずに体重測定

を行ない、そのつど排卵の有無を調べた。各組織はツェンカー・フォルモールまたはブアン液で固定し、パラフィン切片とした後、各種染色を施し検鏡した。

結 果

実験 1 LH-RH 1 mg 水溶液投与に伴うマコガレイの体重変動の様相は Fig. 1 に示した。水溶液の投与によつて多くの個体で翌日わずかな体重増加が認められたが、その効果は持続せず 2 日目には減少を示す個体が多くなった。2 回目の水溶液投与後の体重変動も 1 回目とはほぼ同様で、効果は弱くしかも持続せず全く排卵は誘発されなかつた。対照群では体重はしだいに減少し、排卵は起こらなかつた。そこで 6 日目に前記 2 群をさらにそれぞれ LH-RH 1 mg 乳化液投与群と対照群とに分けて、吸収速度の遅い乳化液の効果を検討した。LH-RH

Fig. 1. Daily change in body weight of plaice, *Limanda yokohamae*, following administration of an aqueous solution of LH-RH (short arrows) and an emulsion of LH-RH (long arrows) in Experiment 1. On the 6th day, both of the initial groups were divided into a control and hormone treated groups employing an emulsion as the vehicle of administration.

a) administration of an aqueous solution of LH-RH.

b) control.

c) administration of an emulsion of LH-RH.

solid line, aqueous solution of LH-RH → emulsion of LH-RH; dotted line, solvent → emulsion of LH-RH.

d) control. solid line, aqueous solution of LH-RH → solvent; dotted line, solvent → solvent.

* Ovulated fish.

Table 1. Changes in body weights, gonadosomatic indices (GSI) and egg water contents following synthetic LH-RH administration in Experiment 1. In the case of ovulated fish, data represent the average recorded on respective days of ovulation, while that for unovulated fish are those recorded on the 13th day at the termination of the experiment.

Treatment		No. of Fish Examined	Change in Body Weight (%)*	GSI (%)*	Water Content of Ovary or Ovulated eggs (%)*
Control	Control	4	-5.3±1.3	21.6±2.9	69.2±0.6
	LH-RH 1 mg ^{oo}	4**	17.1±4.3	42.1±2.8	81.0±1.1
LH-RH 1 mg ^o	Control	4	-4.6±0.2	23.8±0.3	69.2±0.3
	LH-RH 1 mg ^{oo}	5**	17.9±4.5	42.4±2.7	82.4±0.3

* Mean±Standard deviation.

** All fish ovulated.

^o dissolved in physiological salt solution.

^{oo} emulsified with complete adjuvant.

Fig. 2. Daily change in body weight of plaice, *Limanda yokohamae*, following administration of several doses of emulsified LH-RH in Experiment 2.

* Ovulated fish.

1 mg 水溶液 → LH-RH 1 mg 乳化液投与群では急激に体重増加が起こり、全個体が排卵した。LH-RH 1 mg 水溶液 → 対照群では体重はしだいに減少し、排卵は起こらなかった。対照群 → LH-RH 1 mg 乳化液投与群では体重は急激に増加し全個体が排卵した。しかし対照群 → 対照群では体重はしだいに減少し排卵は全く起こらなかった。排卵に伴う体重、生殖腺体重比、卵巣の水分含量の変化は Table 1 に示した。これによると排卵に先立つ体重の増加は卵の吸水現象と深く関連することが分かる。

実験 2 乳化液投与に伴う各群の個体別体重変化の様相は Fig. 2 (a) (b) に示した。LH-RH 1 mg 投与群

では卵の吸水による急激な体重増加が起こり、3～6日目(平均 4.2 日)に 5 尾すべてが排卵した。200 µg 投与群では 4～9 日(平均 6.75 日)に 4 尾排卵したが、残り 1 尾は体重の増加が起こらず排卵しなかった。40 µg 投与群では 7, 10 日目(平均 8.5 日)に 2 尾排卵したが残り 3 尾は排卵しなかった。対照群ではすべてが排卵せず体重はかえって減少した。排卵に伴う体重、生殖腺体重比、卵巣の水分含量の変化は Table 2 にまとめたが、実験 1 の結果に等しい。

対照群の脳下垂体の生殖腺刺激ホルモン分泌細胞は多数の分泌顆粒を持っているのに対し (Plate 1-1), LH-RH 乳化液によつて排卵した個体では顕著な脱顆粒状態

Table 2. Effects of several doses of emulsified LH-RH on ovulation success and changes in body weight, GSI egg water content and egg diameter in Experiment 2. Plus sign (+) denotes ovulatory success, and data represent the average of values recorded on respective days of ovulation. Minus sign (-) indicates ovulatory failure, and data are those recorded on the 12th day at the termination of the experiment

Treatment	Ovulation	No. of Fish	Change in Body Weight (%)**	GSI (%)**	Water Content of Eggs (%)**	Egg Diameter (mm)
LH-RH 1 mg	+	5	21.5±2.9	41.7±2.5	83.0±0.7	0.71
	-	0	—	—	—	—
LH-RH 200 µg	+	4	17.1±0.9	43.0±2.7	83.0±0.7	0.70
	-	1	-3.0	27.0	69.7	0.57
LH-RH 40 µg	+	2	18.1±0.4	42.5±0.4	81.3	0.70
	-	3	-3.2±2.5	29.2±2.2	70.0±0.2	0.59
Control	+	0	—	—	—	—
	-	4*	-3.8±1.0	25.9±1.5	69.5±0.5	0.57

* One fish died on the 6th day.

** Mean±Standard deviation

Table 3. Effects of LH-RH, Puberogen and Synahorin on ovulation success and change in body weight in goby, *Acanthogobius flavimanus*

Treatment	No. of Fish		No. of Ovulated Fish							Percentage Change in Body Weight***	
	Examined	1	2	3	4	5	6	7 days	Ovulated	Unovulated	
Control	10	0	0	0	0	0	0	0		-6.31±2.15	
LH-RH 100 µg*	10	0	0	1	4	1	0	0	5.01±1.43	-2.77±3.93	
LH-RH 350 µg*	10	0	0	2	7	1	0	0	7.04±1.43		
Puberogen° 200 I. U.	10	0	0	9	1	0	0	0	7.76±3.01		
LH-RH 100 µg*	10	0	0	0	0	4	1	0	8.22±2.95	-2.53±2.49	
LH-RH 100 µg**	10	0	0	1	0	0	0	0	0	-2.23±5.14	
Puberogen° 200 I. U.	10	0	1	2	4	3	0	0	7.11±1.72		
Synahorin°° 40 R. U.	10	0	0	1	1	5	0	1	3.28±2.02	-2.42±0.31	

* emulsified with incomplete adjuvant.

** dissolved in 0.6% NaCl solution.

° Human Chorionic Gonadotropin (HCG)

°° HCG (9)+Pituitary Gland (1)

*** Mean±Standard deviation

を示している (Plate 1-3)。卵巣卵は対照群ではほぼ卵黄物質の蓄積を終えた状態にあり、胚胞移動に始まる排卵過程には入っていない (Plate 1-2)。乳化液の注射部位には炎症が起こっているのが認められた。しかし炎症は注射部位の筋節にのみ局限され隣接した筋節には及んでいない (Plate 1-5, 6)。

実験 3 実験結果は Table 3 に示した。LH-RH 乳化液は水溶液に比して排卵誘発効果が強い。LH-RH 350 µg を含む乳化液では全個体が排卵し、そのピークは投与 4 日後であつた。プベローゲン 200 I. U. も排卵誘発力が強く、しかも排卵に要する時間は、水溶液のためと思われるが、LH-RH 乳化液よりも短い。排卵魚では体

重増加が認められたが、対照群では約 6% の減少が起こつた。ホルモン投与群における未排卵魚でも体重減少が認められたが、その減少度は低かつた。

考 察

合成 LH-RH は水溶液では効果が持続せず、マコガレイの排卵を誘発しえなかつたが、乳化液では明らかに効果が持続し、排卵を誘発し得ることが判明した。マハゼでもほぼ同様な結果が得られた。BRETON ら⁹⁾はコイで、CRIM ら¹⁰⁾はブラントラウトで LH-RH 投与による血中ゴナドトロピン量は数分ないし十数分で最高値に達し、まもなく元の値にもどることを報告している。哺乳

Fig. 3. The relation between the dose of LH-RH and ovulation success in several fishes.

Solid triangles, *Carassius auratus*, intraperitoneal injection (ip), aqueous solution (aq), three or five times, LAM *et al.* (1975) (1976); open triangles, *Carassius auratus*, intracranial injection, aq, five times, LAM *et al.* (1976); double circles, *Plecoglossus altivelis*, ip, aq, once, HIROSE and ISHIDA (1974), solid circles, *Acanthogobius flavimanus*, intramuscular injection (im), emulsion (em), once, Experiment 3; solid circles, *Limanda yokohamae*, im, em, once, Experiment 2.

類でもほぼ同様な結果が得られており、LH-RH は体内では短時間で分解されてしまうと考えられている。マコガレイの GTH 細胞は LH-RH 投与によつて脱顆粒状態を示したところから、ゴナドトロピンが放出されたものと考えられる。同様な結果がアユ⁷⁾、キンギョ⁸⁾でも認められている。本実験では LH-RH 投与量の減少に伴つて排卵所要日数が長くなる現象が認められたが、これは LH-RH 量が脳下垂体からのゴナドトロピンの放出量を規定し、ゴナドトロピン量は排卵所要時間を調節していることを示していると考えられる。

魚類では、アユ⁷⁾およびキンギョ^{8,9)}で LH-RH 水溶液が排卵誘発に有効であることが報告されている。これ

までの報告と今回の実験例より得られた体重 1 g 当りの総投与量と排卵誘発率との関係をまとめると Fig. 3 の様になる。これによるとキンギョでは頭蓋内投与が腹腔内投与に比して有効であり、マコガレイにおける乳化液投与結果はこの頭蓋内投与結果にほぼ等しい。水溶液の腹腔内投与では 100% の排卵誘発例はない。キンギョの場合は 3 回あるいは 5 回の繰り返し投与（毎日 1 回）によつて排卵を誘発しており、またマコガレイ、マハゼでは吸収の遅い乳化液が効果が強いという点などから考えると、LH-RH の刺激によつてゴナドトロピンがある程度長時間にわたつて放出される必要があるものと思われる。しかし、短時間の内に成熟過程を経過し、排卵に至る魚種や、卵成熟の進んだ個体では水溶液の 1 回投与でも排卵を誘発し得るものと思われる。一般に魚は取扱いに対して敏感であり、ホルモン投与を何度も繰り返すことはかえつてマイナス効果を与える場合もあり、持続性の高い投与方法は魚類を対象とした場合利点が多い。乳化液による LH-RH 投与法は、効果が長時間持続しその魚自身のゴナドトロピンによつて排卵を誘発し得るという点で有効な方法であると思われる。

なお LH-RH 投与に伴うマコガレイの GTH 細胞の微細形態の変化については改めて報告する予定である。

文 献

- 1) A. V. SCHALLY, A. ARIMURA, Y. BABA, R. M. G. NAIR, H. MATSUO, T. W. REDDING, and L. DEBELJUK: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **43**, 393-399 (1971).
- 2) H. MATSUO, Y. BABA, R. M. G. NAIR, A. ARIMURA, and A. V. SCHALLY: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **43**, 1334-1339 (1971).
- 3) Y. BABA, H. MATSUO, and A. V. SCHALLY: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **44**, 459-463 (1971).
- 4) H. MATSUO, A. ARIMURA, P. M. G. NAIR, and A. V. SCHALLY: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **45**, 882-827 (1971).
- 5) B. BRETON and C. WEIL: *C. R. Acad. Sci. Ser. D*, **277**, 2061-2064 (1973).
- 6) L. W. CRIM and D. J. CLUETT: *Endocr. Res. Commun.*, **1**, 101-110 (1974).
- 7) K. HIROSE and R. ISHIDA: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **40**, 1235-1240 (1974).
- 8) T. J. LAM, S. PANDEY, and W. S. HOAR: *Can. J. Zool.*, **53**, 1181-1192 (1975).
- 9) T. J. LAM, S. PANDEY, Y. NAGAHAMA, and W. S. HOAR: *Can. J. Zool.*, **54**, 816-824 (1976).

Explanation of Plate

- Plate 1-1** Heavily granulated gonadotrophs (dark cells) of the control plaice. $\times 700$
 2 Oocytes of the control plaice. $\times 70$
 3 Degranulated gonadotrophs (arrows) of ovulated plaice with an injection of 1 mg emulsified LH-RH in Experiment 2. $\times 700$.
 4 Ovulated plaice egg following an injection of LH-RH emulsion. $\times 70$
 5 Inflammation of muscle tissue at the site of injection with emulsified LH-RH in plaice. $\times 9$
 6 Inflamed area showing degenerated muscle fibers, advanced phagocytosis and partial recovery of some fibers. $\times 70$