

胎盤性性腺刺激ホルモンにより誘起されたキンギョ, *Carasius auratus*, の卵成熟・排卵時における血中ステロイドホルモン量の変化

誌名	養殖研究所研究報告 = Bulletin of National Research Institute of Aquaculture
ISSN	03895858
著者名	桧垣, 浩彦 長浜, 嘉孝
発行元	水産庁養殖研究所
巻/号	17号
掲載ページ	p. 17-25
発行年月	1990年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



胎盤性性腺刺激ホルモンにより誘起されたキンギョ,
Carassius auratus, の卵成熟・排卵時における
血中ステロイドホルモン量の変化

香川 浩彦*¹⁾・長浜 嘉孝*²⁾

(1990年1月5日受理)

Changes in Plasma Steroid Levels in the Goldfish, *Carassius auratus*, During
Final Oocyte Maturation and Ovulation Induced by a Combination
of Human Chorionic Gonadotropin and Elevated
Holding Temperature

Hirohiko Kagawa*¹⁾ and Yoshitaka Nagahama*²⁾

Levels of plasma estradiol-17 β , testosterone, progesterone, 17 α -hydroxyprogesterone (17 α -OHprog), and 17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (17 α , 20 β -diOHprog) were measured by radioimmunoassay in the goldfish during final oocyte maturation and ovulation induced by a combination of human chorionic gonadotropin (HCG) and elevated holding temperature. Estradiol-17 β was maintained at constant levels (5 ng/ml) during the experimental period (from 0 h to 24 h after HCG injection). Testosterone levels gradually increased after treatment and reached a peak at 3 h followed by a significant decrease at 12 h. Mean levels of all progestational steroids measured (progesterone, 17 α -OHprog, 17 α , 20 β -diOHprog) increased following treatment and reached a peak at 6 h, at which time 2 out of 6 fish contained matured oocytes and the remainder had oocytes of the migratory nucleus stage. There were significant differences in the levels of these steroids between the two groups, the levels being much higher in females which underwent final maturation. The greatest elevation was observed in the level of 17 α , 20 β -diOHprog at 6 h, which was more than 30 times that at 0 h. The levels of progestational steroids rapidly decreased at 12 h, followed by a further decrease at 24 h. In this experiment, all fish ovulated by 12 h following injection. These results are discussed in relation to other studies on changes in plasma steroid levels during final oocyte maturation and ovulation.

Key words: goldfish, human chorionic gonadotropin injection, oocyte maturation, ovulation, plasma steroids

サケ科魚類, 特にアマゴでは, 卵成熟・排卵に関わるステロイドホルモンの役割について, 血中ステロイドの動態や *in vitro* でのステロイド産生機構に関する研究から, estradiol-17 β (E₂) が卵黄形成に関連した重要なホルモンであり (Kagawa *et al.* 1981), testosterone (T) がその前駆体である

*¹⁾ 養殖研究所 (National Research Institute of Aquaculture, Nansei, Mie 516-01, Japan)

*²⁾ 基礎生物学研究所 (National Institute for Basic Biology, Okazaki, Aichi 444, Japan)

ことが示唆されている (Kagawa *et al.* 1985)。また、脊椎動物で初めて、 $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one ($17\alpha, 20\beta$ -diOHprog) がサケ科魚の卵成熟誘起ステロイドとして同定された (Nagahama and Adachi 1985, Nagahama 1987)。一方、一回の産卵期に複数回産卵を繰り返すいわゆる多回産卵魚では、卵成熟・排卵前後の血中ステロイドの動態を詳細に調べた報告はサケ科魚に比較して少ない (Kime and Dolben 1985, Kobayashi *et al.* 1987, Matsuyama *et al.* 1988)。これは、卵成熟・排卵の過程が比較的短時間に起こり、この間のステロイドホルモン量の急激な変動をとらえにくいと考えられる。したがって、卵成熟・排卵における血中ステロイドホルモンの変動を正確に知るには、卵成熟・排卵を人為的な方法で確実に誘起することが必要となる。ヒト胎盤性性腺刺激ホルモン (HCG) はこれら多回産卵魚を中心に多くの魚 (ボラ, Kuo *et al.* 1974; クロダイ, Gordin and Zohar 1978; キンギョ, Stacey *et al.* 1979; catfish, Eding *et al.* 1982; blue-spotted grouper, Kuo *et al.* 1988; コイ, ハクレン, ドジョウ, Peter *et al.* 1988) の成熟・排卵を誘発することはよく知られている。しかし、HCG を投与して誘起された卵成熟・排卵時の血中ステロイドホルモンの動態を詳細に調べた報告はほとんどない (Kime and Dolben 1985)。

キンギョは、水温 12°C で飼育し、卵巣を充分に発達させた後に、HCG を注射するとともに水温を 20°C に上げると、ほとんどの魚で6時間後までには卵成熟、9時間後までには排卵を誘起させることができる。このように、キンギョは多回産卵魚の卵成熟・排卵時の血中ステロイドホルモンの変化を知る上で有効な材料と考えられる。そこで、本研究では、多回産卵魚の卵成熟・排卵機構を解明するための基礎的知見を得るため、HCG 投与後から卵成熟・排卵後までの血中 E_2 , T, progesterone (P), 17α -hydroxyprogesterone (17α -OHprog), および $17\alpha, 20\beta$ -diOHprog 量の変化を詳細に調べた。

材料および方法

材料には水温 12°C の水槽中で2カ月以上飼育されていた体重約 30 g, 体長約 9 cm のワキンを用いた。これらの魚の卵巣中では、卵黄形成は終了しているが成熟していない卵 (卵核胞は卵母細胞の中央に位置し、第一次成熟分裂前期の状態にある) が多数認められた。これらの魚を用いて以下の実験を行った。まず、材料魚にキンギョ用リング液に溶解したヒト胎盤性性腺刺激ホルモン (HCG, Sigma) を 4 IU/g 体重、午前9時から10時の間に腹腔内に注射し、水温 20°C の水槽に移した。次に注射後1.5, 3, 6, 12, 24時間および注射直前 (0時間) にそれぞれ5-6尾の魚から採血した。魚は尾柄部を切断し、ヘマトクリット管により血液を採集した。血液は 10,000 rpm, 5分間遠心した後、血漿を分離しステロイド測定を行うまで -20°C で保存した。また、採集魚の卵巣を取り出し、肉眼観察により卵細胞の成熟段階を調べた。

血漿中のステロイド (E_2 , T, P, 17α -OHprog, $17\alpha, 20\beta$ -diOHprog) 濃度は、Kagawa *et al.* (1981) の方法に従って、ラジオイムノアッセイ法により測定した。それぞれのステロイド測定法の感度、精度等の詳細はすでに発表した (E_2 と P, Nagahama *et al.* 1982; T, Kagawa *et al.* 1984; 17α -OHprog, Kagawa *et al.* 1983a; $17\alpha, 20\beta$ -diOHprog, Young *et al.* 1983)。

グラフ中の数値は平均±標準誤差で示した。有意差は Student-Newman-Keul's multiple range test を用いて解析した。

結 果

卵巣卵の肉眼観察の結果、注射後3時間目では顕著な変化は認められなかったが、注射後6時間で6尾中4尾が核移動期の卵細胞（卵核胞が動物極に移動し透明な点として外観できる）、残りの2尾が成熟卵（卵核胞が消失し、細胞質が透明化している）を有していることが確かめられた。また注射後12および24時間ではすべての個体で排卵（腹部圧迫により成熟卵が排出される）が確認された。

E_2 量 (Fig. 1) は注射後0時間から24時間の間に有意な変動は認められず、ほぼ一定値 (4 ng/ml) を保った。

T 量 (Fig. 2) は注射後0時間 (10 ng/ml) から徐々に増加し、3時間で最高値 (16 ng/ml, $p < 0.05$) を示したが、注射後12時間で急激に ($p < 0.01$) 減少し、24時間目でも低値 (5 ng/ml) を示した。

P 量 (Fig. 3) は注射後0時間 (0.3 ng/ml) から急激に増加し、6時間後に最高値 (2.1 ng/ml, $p < 0.01$) に達し、24時間後に0.4 ng/mlに減少した ($p < 0.01$)。また、注射後6時間目にすでに成熟した卵を有していた魚では平均約3.9 ng/mlであったのに対し、核移動期の卵を有していた魚では平均約0.9 ng/mlと低値を示した。

17α -OHprog 量 (Fig. 4) はPとほぼ同様に变化した。注射後0時間 (0.5 ng/ml) から徐々に増加し6時間後に最高値 (6.8 ng/ml, $p < 0.01$) を示し、24時間後に減少 (1.5 ng/ml) した ($p < 0.01$)。また、Pと同様、卵成熟を起こした魚で 17α -OHprog量は高値 (15 ng/ml) を示し、核移動期の魚で低値 (6 ng/ml) を示した。

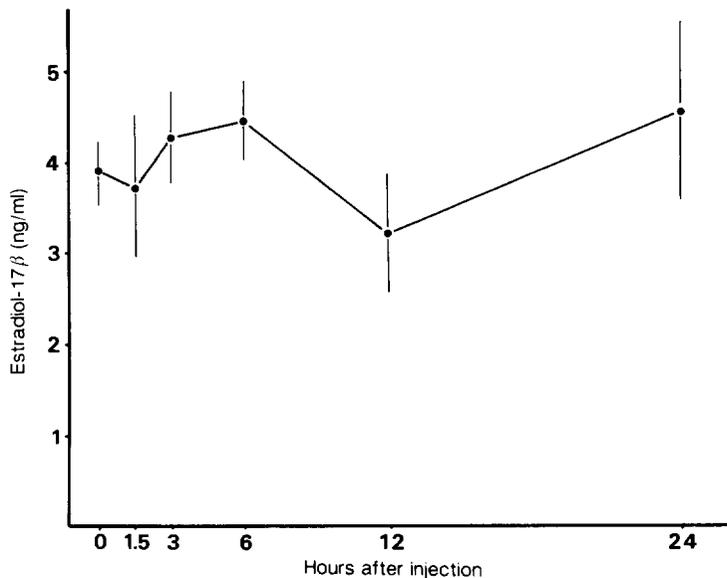


Fig. 1 Changes in plasma estradiol-17 β levels in the goldfish during final oocyte maturation and ovulation induced by a combination of human chorionic gonadotropin and elevated holding temperature. Each value represents the mean \pm SEM.

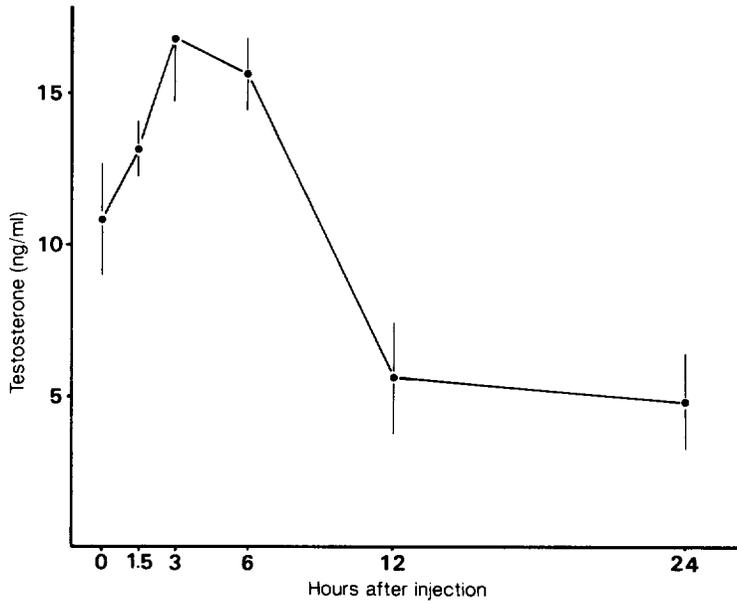


Fig. 2 Changes in plasma testosterone levels in the goldfish during final oocyte maturation and ovulation induced by a combination of human chorionic gonadotropin and elevated holding temperature. Each value represents the mean \pm SEM.

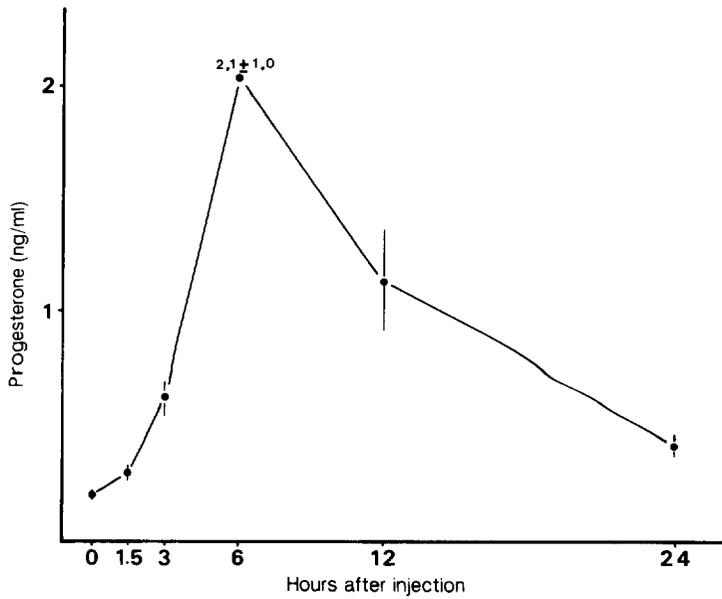


Fig. 3 Changes in plasma progesterone levels in the goldfish during final oocyte maturation and ovulation induced by a combination of human chorionic gonadotropin and elevated holding temperature. Each value represents the mean \pm SEM.

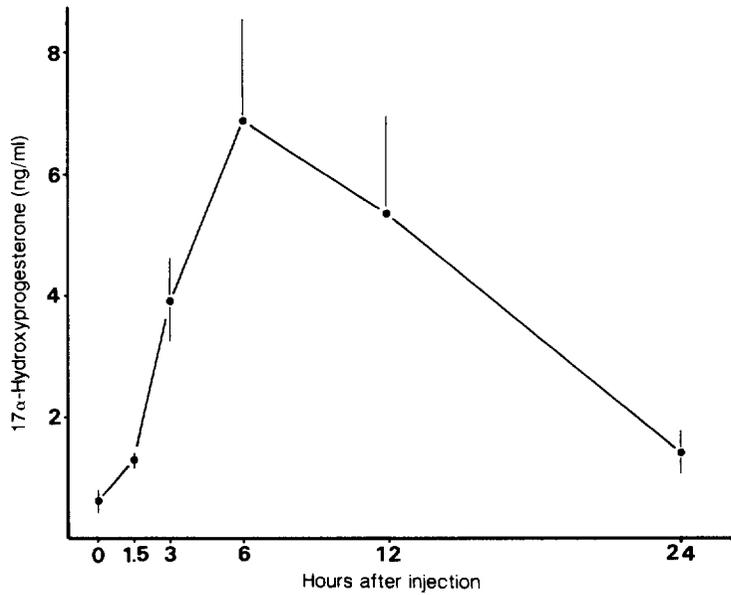


Fig. 4 Changes in plasma 17 α -hydroxyprogesterone levels in the goldfish during final oocyte maturation and ovulation induced by a combination of human chorionic gonadotropin and elevated holding temperature. Each value represents the mean \pm SEM.

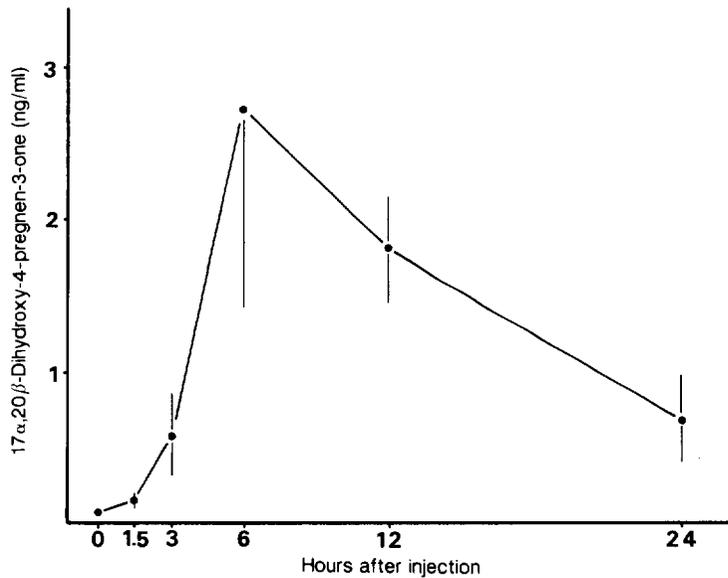


Fig. 5 Changes in plasma 17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one levels in the goldfish during final oocyte maturation and ovulation induced by a combination of human chorionic gonadotropin and elevated holding temperature. Each value represents the mean \pm SEM.

17 α , 20 β -diOHprog 量 (Fig. 5) は注射後 3 時間目までは比較的 low 値 (0.08-0.6 ng/ml) を示したが 6 時間後に急激に上昇し最高値 (2.7 ng/ml, $p < 0.01$) を示し、その後 24 時間目まで急激に減少した (0.7 ng/ml, $p < 0.01$)。また、注射後 6 時間目に卵成熟を起こした魚では高値 (6 ng/ml) を示したが、核移動期の卵細胞を有していた魚では低値 (0.6 ng/ml) のままであった。

考 察

水温 12°C で飼育し卵黄形成を完了したキンギョに HCG を投与し水温を 20°C に上昇することにより卵成熟・排卵を誘起させても、血中 E₂ 量 (約 5 ng/ml) は変化しなかった。この血中量は自然状態で飼育されていた産卵期のキンギョ (Kagawa *et al.* 1983a) や水温を上昇させて排卵を誘起したキンギョ (Kobayashi *et al.* 1987) およびその他のコイ科魚の排卵時の値 (Billard *et al.* 1978, Horváth *et al.* 1978, Fostier *et al.* 1979, Weil *et al.* 1980) とほぼ同じである。また、自然排卵したキンギョ (Kagawa *et al.* 1983a) および水温上昇により排卵を誘起したキンギョ (Kobayashi *et al.* 1987) と同様な実験でも排卵後 E₂ 量の減少は認められなかった。さらに、サケ科魚 (Kagawa *et al.* 1981, Kagawa *et al.* 1983b, van Bohemen and Lambert 1981) で報告されているような卵成熟直前の E₂ 量の急激な減少も認められなかった。この差異は、キンギョでは、サケ科魚と異なり産卵期の卵巣中に多数の卵黄形成期の卵細胞を有しており、これらの濾胞組織で E₂ が産生されるため (Kagawa *et al.* 1984)、血中 E₂ 量に減少がみられないものと考えられる。

血中 T 量は注射後徐々に上昇し 3 時間後に最高値 (15 ng/ml) に達した。この量はキンギョ (Kagawa *et al.* 1983a, Kobayashi *et al.* 1987) や plaice (Weil *et al.* 1980) などで報告されている量とよく一致する。しかし、T 量は卵成熟終了後 (12-24 時間) に注射前よりもさらに減少した。この卵成熟完了後に認められた血中 T 量の急激な減少は HCG 投与後に卵濾胞組織の T 産生量が急激に減少するため (Nagahama *et al.* 1986) と考えられる。

本研究で測定した 3 種のプロゲステロン系ステロイドの血中濃度は HCG 注射後ほぼ同様の变化を示し、いずれも自然状態で調べられた排卵前後のキンギョの血中濃度 (Kagawa *et al.* 1983a) よりも 2-10 倍高い値を示した。キンギョは自然状態では通常真夜中から明け方にかけて成熟・排卵するものと考えられ (Stacey *et al.* 1979)、我々の以前の報告 (Kagawa *et al.* 1983a) では血液を採集したのが午前 8-9 時で、この時までにはすでに成熟・排卵後数時間経過していたため低い値を示したものと考えられる。したがって、自然状態でも卵成熟完了時から排卵時にかけての血中ステロイド量を測定すれば、さらに高値が得られるものと思われる。事実、Kobayashi *et al.* (1987) の報告によれば水温上昇により排卵を誘起されたキンギョでは 20:00 から 24:00 にかけて高値の 17 α , 20 β -diOHprog (15-20 ng/ml) が測定されている。

プロゲステロン系のステロイドは、卵成熟が完了した注射後 6 時間で最高値に達し、以後 12-24 時間にかけて急激に減少した。特に 17 α , 20 β -diOHprog は 0 時間から 6 時間にかけて 30 倍以上にも増加し、24 時間目に最高値の 1/5 に減少した。Nagahama *et al.* (1986) は、本研究と同様の方法で卵成熟を人為的に誘起させたキンギョの卵濾胞組織の *in vitro* ステロイド産生能を検討し、17 α -OHprog から 17 α , 20 β -diOHprog への転換に必要なステロイド-20 β -水酸基脱水素酵素 (20 β -HSD) の活性は卵成熟を完了した時期で最高となり、以後急激に減少することを報告している。したがって、本研究で認められた HCG 投与後の血中 17 α , 20 β -diOHprog の上昇は 20 β -HSD の活性によるものと考えられる。これらの結果と我々がすでに報告した (Nagahama *et al.* 1983) キンギョの *in*

vitro 卵成熟誘起に $17\alpha, 20\beta$ -diOHprog が最も有効である事実を考え合わせると、サケ科魚と同様 (Nagahama 1987), キンギョでも $17\alpha, 20\beta$ -diOHprog が卵成熟誘起ステロイドである可能性が極めて高い。

本研究では、注射後24時間の魚の血中プロゲステロン系ステロイド量はホルモン投与前の低い値に戻った。サケ科魚、特にニジマスでは排卵後1-2週間は血中 $17\alpha, 20\beta$ -diOHprog が高値を示すことが報告されている (Scott *et al.* 1983)。このサケ科魚とキンギョとにみられる相違は、排卵後濾胞のステロイドホルモン産生能の違いに起因するものと考えられる。このことは、形態学的研究からも支持され、キンギョの卵濾胞組織は排卵後1日以内にかなり崩壊するが (Nagahama *et al.* 1976), ギンザケ (Nagahama *et al.* 1978) やアメマス (Kagawa *et al.* 1981) ではその形態はかなりの期間正常に維持されることが報告されている。

本研究では、多回産卵魚における卵成熟・排卵時の血中ステロイドホルモン量の急激な変化を明らかにすることができた。今後は、サケ科魚類とは異なるこれら多回産卵魚の卵成熟・排卵時のステロイドホルモンのリズムがどのような機構によって支配されているのか、視床下部-脳下垂体系およびステロイドフィードバック機構などについて明らかにしていく必要がある。

要 約

ヒト胎盤性性腺刺激ホルモン (HCG) を投与すると同時に水温を上昇させて最終成熟・排卵を誘起したキンギョの血中 estradiol- 17β (E_2), testosterone (T), progesterone (P), 17α -hydroxyprogesterone (17α -OHprog), および $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one ($17\alpha, 20\beta$ -diOHprog) 量の変化をラジオイムノアッセイ法により測定した。その結果, E_2 は実験期間中 (0時間-24時間) 変化することなく一定の値 (5 ng/ml) を保った。T量は3時間目まで徐々に上昇し (10-15 ng/ml), 12時間目で減少した (5 ng/ml)。測定した3種のプロゲステロン系ステロイドは同様の変化を示し、注射後6時間目に最高値に達した。特に, $17\alpha, 20\beta$ -diOHprog は実験開始時と比べて30倍も増加した。この時, 6尾中2尾が成熟卵を有し, 残りは核移動期にあり, これら3種のステロイド量は成熟卵を有していた魚のほうが核移動期のものよりも高い値を示した。その後, これら3種のプロゲステロン系ステロイドは12-24時間にかけて急激に減少した。実験に用いた魚は注射後12時間目までにすべて排卵した。

文 献

- Billard, R., B. Breton, A. Fostier, B. Jalabert and C. Weil 1978. Endocrine control of the teleost reproductive cycle and its relation to external factors: Salmonid and cyprinid models. pp. 37-48, In "Comparative Endocrinology" ed. by P. J. Gaillard and H. H. Boer, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- Bohemen, van C. G. and J. G. D. Lambert 1981. Estrogen synthesis in relation to estrone, estradiol, and vitellogenin plasma levels during the reproductive cycle of the female rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Gen. Comp. Endocrinol. 45: 105-114.
- Eding, E. H., J. A. L. Jansen, G. H. J. Kleine Staarman and C. J. J. Richter 1982. Effects of human gonadotropin (hCG) on maturation and ovulation of oocytes in the catfish *Clarias lasera* (C. & V.). pp. 164-173, In "Proc. Int. Symp. Reproductive Physiology of Fish" ed. by C. J. J. Richter and H. J. Th. Goos, Wageningen, The Netherlands.
- Fostier, A., B. Breton and B. Jalabert 1979. Stimulation hypophysaire de la secretion oestradiol- 17β chez la

- carpe commune, *Cyprinus carpio* L. Annales d'Endocrinologie (Paris) 40: 83-84.
- Gordin, H. and Y. Zohar 1978. Induced spawning of *Sparus aurata* by means of hormonal treatment. Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys. 18: 985-990.
- Horváth, L., E. Poteczin, G. K. Fehér and T. Fehér 1978. Isolation and quantitative determination of sex hormones in carps (*Cyprinus carpio* L.). Acta Biol. Acad. Sci. Hung. 29: 23-27.
- Kagawa, H., K. Takano and Y. Nagahama 1981. Correlation of plasma estradiol-17 β and progesterone levels with ultrastructure and histochemistry of ovarian follicles in the white-spotted char, *Salvelinus leucomaenis*. Cell Tissue Res. 218: 315-329.
- Kagawa, H., G. Young, S. Adachi and Y. Nagahama 1985. Estrogen synthesis in the teleost ovarian follicle. The two-cell type model in salmonids. pp. 20-25. In "Salmonid Reproduction", ed by R. N. Iwamoto and S. Sower, Washington Sea Grant Program, University of Washington, Seattle.
- Kagawa, H., G. Young and Y. Nagahama 1983a. Changes in plasma steroid hormone levels during gonadal maturation in female goldfish *Carassius auratus*. Nippon Suisan Gakkaishi 49: 1783-1787.
- Kagawa, H., G. Young and Y. Nagahama 1983b. Relationship between seasonal plasma estradiol-17 β and testosterone levels and *in vitro* production by ovarian follicles of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). Biol. Reprod. 29: 301-309.
- Kagawa, H., G. Young and Y. Nagahama 1984. *In vitro* estradiol-17 β and testosterone production by ovarian follicles of the goldfish, *Carassius auratus*. Gen. Comp. Endocrinol. 54: 139-143.
- Kime, D. E. and I. P. Dolben 1985. Hormonal changes during induced ovulation of the carp, *Cyprinus carpio*. Gen. Comp. Endocrinol. 58: 137-149.
- Kobayashi, M., K. Aida and I. Hanyu 1987. Hormonal changes during ovulation and effects of steroid hormones on plasma gonadotropin levels and ovulation in goldfish. *ibid.* 67: 24-32.
- Kuo, C., Y. Ting. and S. Yeh 1988. Induced sex reversal and spawning of blue-spotted grouper, *Epinephelus fario*. Aquaculture 74: 113-126.
- Kuo, C., C. E. Wash and Z. H. Shehadeh 1974. A procedural guide to induce spawning in grey mullet (*Mugil cephalus* L.) females by injection of human chorionic gonadotropin. *ibid.* 3: 1-14.
- Matsuyama, M., S. Adachi, Y. Nagahama and S. Matsuura 1988. Diurnal rhythm of oocyte development and plasma steroid hormone levels in the female red sea bream, *Pagrus major*, during the spawning season. *ibid.* 73: 357-372.
- Nagahama, Y. 1987. 17 α , 20 β -Dihydroxy-4-pregnen-3-one: A teleost maturation-inducing hormone. Develop. Growth and Differ. 29: 1-12.
- Nagahama, Y. and S. Adachi 1985. Identification of maturation-inducing steroid in a teleost, the amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). Develop. Biol. 109: 428-435.
- Nagahama, Y., K. Chan, W. S. Hoar 1976. Histochemistry and ultrastructure of pre- and post-ovulatory follicles in the ovary of the goldfish, *Carassius auratus*. Can. J. Zool. 54: 1128-1139.
- Nagahama, Y., W. C. Clarke and W. S. Hoar 1978. Ultrastructure of putative steroid-producing cells in the gonad of coho (*Oncorhynchus kisutch*) and pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*). *ibid.* 56: 2508-2519.
- Nagahama, Y., F. W. Goetz and J. D. Tan 1986. Shift in steroidogenesis in the ovarian follicles of the goldfish (*Carassius auratus*) during gonadotropin-induced oocyte maturation. Develop. Growth and Differ. 28: 555-561.
- Nagahama, Y., K. Hirose, G. Young, S. Adachi, K. Suzuki and B. Tamaoki 1983. Relative *in vitro* effectiveness of 17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one and other pregnene derivatives on germinal vesicle breakdown in oocytes of ayu (*Plecoglossus altivelis*), amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*), and goldfish (*Carassius auratus*). Gen. Comp. Endocrinol. 51: 15-23.
- Nagahama, Y. and H. Kagawa 1982. *In vitro* steroid production in the postovulatory follicles of the amago salmon, *Oncorhynchus rhodurus*, in response to salmon gonadotropin. J. Exp. Zool. 219: 105-109.
- Peter, R. E., H. R. Lin and G. van der Kraak 1988. Induced ovulation and spawning of cultured freshwater fish in China: Advances in application of GnRH analogues and dopamine antagonist. Aquaculture 74: 1-10.
- Scott, A. P., J. P. Sumpter and P. A. Hardiman 1983. Hormone changes during ovulation in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). Gen. Comp. Endocrinol. 49: 128-134.
- Stacey, N. E., A. F. Cook and R. E. Peter 1979. Spontaneous and gonadotropin-induced ovulation in the

- goldfish, *Carassius auratus* L.: Effects of external factors. J. Fish Biol. 15: 305-316.
- Weil, C., A. Fostier, L. Horváth, S. Marlot and M. Berscenyi 1980. Profiles of plasma gonadotropin and 17 β -estradiol in the common carp, *Cyprinus carpio* L., as related to spawning induced by hypophysation or LH-RH treatment. Reprod. Nutr. Dev. 20: 1041-1050.
- Young, G., L. W. Crim, H. Kagawa, A. Kambegawa and Y. Nagahama 1983. Plasma 17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one levels during sexual maturation of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*): Correlation with plasma gonadotropin and *in vitro* production by ovarian follicles. *ibid.* 51: 96-105.