

全雌アユの生産に関する研究—I

性転換雄の作出条件の検討

桑田知宣・大仲知樹*・一柳哲也・荒井 真

Studies on the Production of All Female Groups in Ayu,
Plecoglossus altivelis

Induction of Sex-Reversed Male by Treatment of Methyltestosterone

Tomonori KUWADA・Tomoki OHNAKA*・Tetsuya ICHIYANAGI・
Makoto ARAI

アユは淡水魚の中で特に美味であるとされ、古来から食材として利用されてきた。中でも成熟期の雌は「子持ちアユ」と呼ばれ、甘露煮や昆布巻きの材料として人気が多く、通常のものより高値で取引されている。逆に成熟期の雄は、体色が黒ずみ痩せているため、通常のものより商品価値が低い。このためアユ養殖においては、付加価値の高い子持ちアユを効率的に生産できる全雌種苗の開発が望まれている。

近年、多くの魚種において性転換雄の利用による全雌生産技術が確立し、¹⁻³⁾実用化されている。⁴⁾アユの性転換雄作出についてもいくつかの報告がなされ、⁵⁻⁹⁾それを利用して全雌を作出できることが報告されている。⁹⁻¹²⁾しかし、未だにアユの全雌種苗の実用化はなされていない。その原因として各報告ごとに 17α -メチルテストステロン（以下 17α -MT）の投与期間、有効投与濃度が異なる上に、性転換雄の作出率が他の魚種に比べて低率であることがあげられる。そこで安定的なアユの性転換雄の作出方法を開発するために 17α -MTの投与期間について検討を加えたところ、若干の知見が得られたので報告する。

材料及び方法

試験 1

試験は1998年11月から1999年10月にかけて行った。 17α -MTの投与期間を変えた3つの試験区と対照区を設定した。容量500 ℥の4槽のポリカーボネート製水槽に木曽川天然採捕アユより採卵し養成したふ化18日目の仔魚を1000尾ずつ収容した。 17α -MT（シグマ社製）をエタノールに溶解した後、市販のアユ初期飼料に吸着さ

せ 17α -MT添加飼料を作成した。 17α -MTの飼料への添加量は、辻村ら⁶⁾に従い、 $0.4 \mu\text{g} / \text{g} \cdot \text{diet}$ とした。飼料に対するエタノールの割合は4%とした。ふ化19日目より試験区への 17α -MT添加飼料の給餌を開始した。各試験区の 17α -MTの投与期間が異なるように 17α -MTの投与終了時期を変えた。ふ化120日目に 17α -MT添加飼料の給餌を中止した区を1区、150日目を2区、180日目を3区とした。各区とも 17α -MT投与終了時に供試魚を無作為に抽出し体重と全長を測定した。対照区にはエタノールのみを添加したアユ初期飼料

* 岐阜県魚苗センター

を試験区と等量給餌した。飼育水には当初、人工汽水（アレン組成C ℥ 3%）を用い、ふ化150日目に淡水化を開始し、以後井戸水で飼育を行った。試験期間中の飼育水温は自記式水温計で記録した。

17 α -MT投与終了後、各区の魚を産卵期まで飼育し、生残した全ての供試魚を開腹して各区の性比を調査した。

試験 2

試験は1999年11月から2000年10月にかけて行った。供試魚には試験1で作出された性転換雄（雌雄同体魚）を利用して作出した全雌魚を用いた。容量500 ℥の4槽のポリカーボネート製水槽にふ化19日目の供試魚を1000尾ずつ収容し3槽を試験区、1槽を対照区とした。17 α -MT添加飼料の作成及び添加量は試験1と同様とした。ふ化20、36、56日目より各水槽への17 α -MT添加飼料の給餌を開始し、それぞれを1区、2区、3区とした。ふ化163日目に3区の魚を2等分し、一方は17 α -MTの投与を継続し3区とし、他方は17 α -MTの投与を中止し4区とした。1、2、3区には17 α -MT添加飼料をふ化204日目まで給餌した。各試験区の17 α -MT投与開始時の全長と17 α -MT投与終了時の全長及び体重を調査した。対照区にはエタノールのみを添加したアユ初期飼料を試験区と等量給餌した。飼育水には当初人工汽水（アレン組成C ℥ 3%）を用い、ふ化141日目に淡

水化を開始し、以後井戸水で飼育を行った。ふ化145日後に対照区の魚を無作為に12尾抽出し、生殖腺を摘出後、スライドグラス上で押しつぶして検鏡し、卵母細胞の有無を指標に性分化状況を調査した。試験期間中の飼育水温は自記式水温計で記録した。

17 α -MT投与終了後、各区の魚を産卵期まで飼育し、生残した全ての供試魚を開腹して各区の性比を調査した。その際に性転換雄（雌雄同体を含む）の体重、生殖腺重量、精巣重量を測定した。

結 果

試験 1

17 α -MT投与期間中の飼育水温を第1図に示した。17 α -MT投与開始時及び終了時の供試魚の全長及び体重を第1表に示した。各区の産卵期における雄魚の出現率と17 α -MT投与期間との関係について第2表に示した。対照区には雄と雌がほぼ1:1で出現した。一方、各試験区の雄の比率は、対照区のそれに比べて高く、17 α -MTの投与終了が遅く、長期間投与した区ほど雄の出現率が高まる傾向があった。

第1表 試験開始時及びホルモン投与終了時の体のサイズ

	全長±標準偏差	体重±標準偏差
	mm	g
試験開始時	11.8±1.5	—
1区投与終了時	53.5±5.0	0.97±0.37
2区投与終了時	62.5±6.1	1.62±0.56
3区投与終了時	66.4±5.2*	4.06±0.94

*は被鱗体長

第2表 産卵期の各区の性比

区	ホルモン投与期間	雄	雌	雌雄同体	雄出現率
対照区	—	109 尾	108 尾	0尾	50.2%
1区	ふ化19~120日後	176 尾	170(2)尾	0尾	50.9%
2区	ふ化19~150日後	180 尾	166 尾	1尾	51.9%
3区	ふ化19~180日後	137(1)尾	108(5)尾	1尾	55.7%

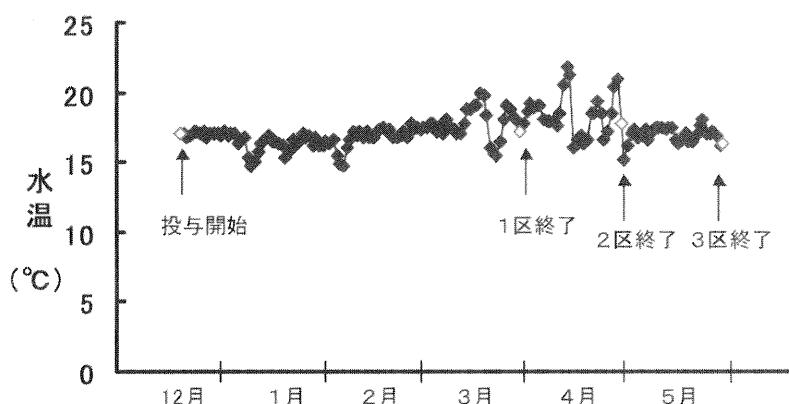
()内は生殖腺が未発達であった個体数

試験 2

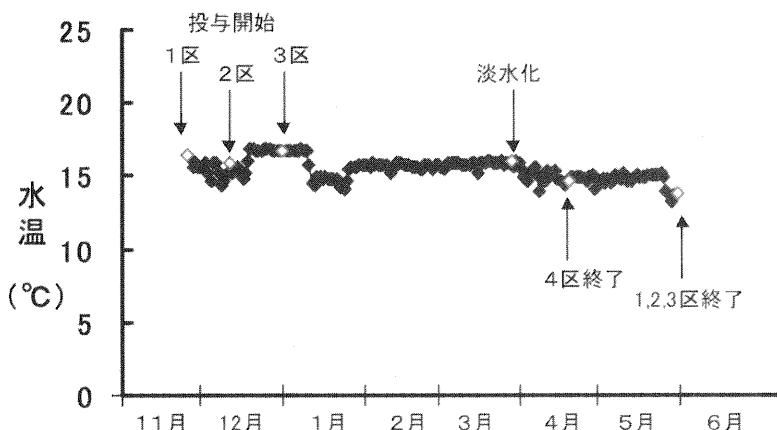
17α -MT投与期間中の飼育水温を第2図に示した。 17α -MT投与期間中に水質の悪化によると思われる大量死があり、例年に比べて各区の 17α -MT投与終了時の生残が悪かった。また、3区についてはその後ちゅうちん病が発症し、ほぼ半数が斃死した。それ以外の期間においては、散発的な斃死が認められたがおおむね順調であった。対照区のふ化145日後（全長70mm前後）の生殖腺を検鏡したところ、全ての個体に明瞭な卵母細胞が認められ、雌への分化が確認できた。

17α -MT投与開始時及び終了時の供試魚の全長及び体重を第3表に示した。各区の産卵期の雄魚及び雌雄同

体魚の出現状況と 17α -MT投与期間との関係を第4表に示した。対照区は全て雌であった。一方、各試験区には、雄または雌雄同体魚が出現した。従ってこれらの雄または雌雄同体魚は性転換雄であると考えられる。典型的な雄の外観を示し、臀鰭が雄型である個体は、雄または雌雄同体魚であった。臀鰭が雄型でも雌型でもない個体が多数出現した。それらの大部分は雌または不稔であったが、中には雌雄同体魚も認められた。生殖腺が完全に精巣化した個体では、左葉のみ発達した精巣が認められたが、全ての個体の輸精管が不完全で腹部圧迫によって精液を搾出することは出来なかった。精巣の形態はラグビーボール様の橢円形であった。雌雄同体についても、



第1図 試験1の 17α -MT投与期間中の飼育水温



第2図 試験2の 17α -MT投与期間中の飼育水温

生殖腺が左葉のみである例が多く、その一部が精巢化していた。しかし、少数ではあるが左右の生殖腺が発達している個体が存在し、それらの中には右葉のみ精巢化している例も確認された。なお、右葉のみ生殖腺が発達し

ている事例は1例も観察されなかった。 17α -MTの投与開始時期が異なる1、2、3区の雄の出現率を比較すると、 17α -MTの投与開始が早い区ほど高い傾向があり、1区と2区には有意差はないが、2区と3区には有

第3表 試験2のホルモン投与開始時及び終了時の体サイズ

区	開始時全長 mm	終了時全長 mm		終了時体重 g
		g	g	
1区	10.2±1.1	90.9±6.4	5.7±1.2	
2区	16.7±1.7	88.5±6.8	5.2±1.3	
3区	25.6±2.9	89.8±6.5	5.8±1.7	
4区	25.6±2.9	68.6±6.3	2.2±0.6	

平均値±標準偏差

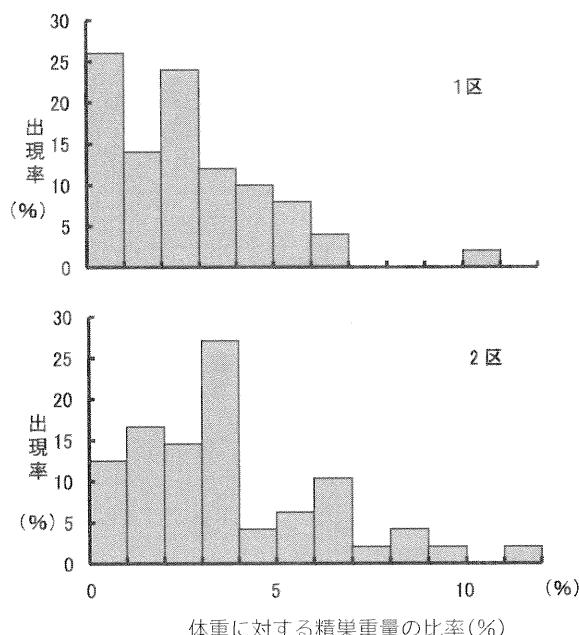
第4表 産卵期の試験2の各区の性比

区	ホルモン投与期間	雄 尾	雌雄同体 尾	雌 尾	不稔魚 尾	作出率		不稔化率 %
						1	2	
対照区	—	0	0	252	0	0.0	0.0	0.0
1区	ふ化20~204日後	33	26	85	78	14.9	26.6	35.1
2区	ふ化36~204日後	25	24	94	53	12.8	25.0	27.0
3区	ふ化56~204日後	1	6	42	14	1.6	11.1	22.2
4区	ふ化56~163日後	0	5	138	8	0.0	3.3	5.3

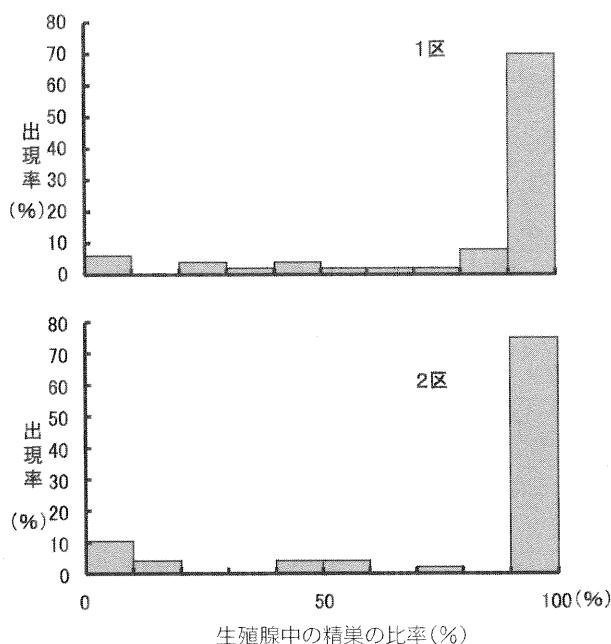
作出率1は、(雄の個体数／調査尾数) × 100

作出率2は、(雄と雌雄同体の個体数／調査尾数) × 100

不稔化率は、(不稔魚の個体数／調査尾数) × 100



第3図 性転換雄の体重に対する精巣重量の割合



第4図 性転換雄の生殖腺中の精巣の割合

意差が認められた（G検定、 $P < 0.05$ ）。性転換雄に雌雄同体魚を含めた場合の出現率も同様に、 17α -MTの投与開始が早い区ほど高い傾向があり、1区と2区には有意差はないが、2区と3区には有意差が認められた。 17α -MTの投与終了時期が異なる3区と4区を比較すると、終了時期が遅い3区の性転換雄（雌雄同体魚を含む）の出現率は、4区のそれより有意に高かった。

各試験区には生殖腺の発達が未熟な不稔魚が出現した。 17α -MTの投与開始時期が異なる1, 2, 3区の不稔魚出現率を比較すると、 17α -MTの投与開始が早い区ほど高い傾向があり、1区と3区の間で有意な差が認められた。また、 17α -MTの投与終了時期が異なる3区と4区を比較すると、終了時期が遅い3区の不稔魚出現率は4区のそれより有意に高かった。

1区と2区の性転換雄の魚体重と精巣との関係を第3図に、また、生殖腺に占める精巣の割合を第4図に示した。1区の性転換雄の魚体重に対する精巣重量の割合の最頻値は1%未満の階級であった。一方、2区の最頻値は3～4%の階級であった。このような違いによって1区の性転換雄の魚体重に対する精巣重量の割合の平均値（2.7%）は、2区のそれ（3.6%）に比べて小さかった。性転換雄の生殖腺に占める精巣重量比の最頻値は、1区、2区ともに90～100%の階級であり、この階級が全体の70%以上を占めた。

考 察

試験2の結果よりもアユについても 17α -MTの投与によって生殖腺が完全に精巣化した性転換雄を作出できることが確認された。従って、試験1における雄への性比の偏りは雌から雄への性転換によるものと考えられる。

魚類では、エストロジエンが卵巣分化を、エストロジエンの欠如が精巣分化を誘導する考えられている。¹⁵⁾ 雌から雄への性転換の場合、外因性のアンドロジエンは、ステロイド代謝酵素群の発現を抑制することによって、内因性のエストロジエンの産生を低下させ、精巣への分化の転換を起こすと考えられており、¹⁶⁾ 形態的性分化期に先立つ生理的性分化期前にアンドロジエンの投与を開始すると有効であることが明らかにされている。^{13, 14)} アユの形態的性分化期はふ化90日から120日後（全長35～40mm）であるが、¹⁵⁾ 生理的性分化期については知られていない。試験2で全長16.7mmより投与を開始した2区の性転換率が全長25.6mmより開始した3区のそれより有

意に高かったことより、この間に多くのアユで生理的性分化が始まったと推察される。辻村らは、ふ化44日後（全長16.8mm）より投与を開始した区の性転換雄の出現率はふ化58日後（全長24mm）より開始した区の出現率より高いが、⁶⁾ ふ化23日（全長11.3mm）より開始した区の性転換雄の出現率は、ふ化55日（全長16mm）より開始した区の出現率よりむしろ低かったことを報告している。⁶⁾ 本研究の結果は、全長16.7mmに 17α -MTの投与を開始したほうが全長25.6mmに開始するより良いという点で辻村らの結果に一致したが、全長10.2mmから開始したほうがさらに性転換雄の出現率が高いという点で辻村らの結果と異なっていた。なぜこのような相違が生じたのかは定かではないが、全長10.2mmより投与した区の性転換雄の魚体重に占める精巣重量の割合が全長16.7mmからのそれより低いことや 17α -MTの投与開始が早いほど不稔魚の出現率が高まるなど本研究においても早期投与の悪影響が認められる。また、全長10.2mmから投与した区の性転換雄の出現率と全長16.7mmからのそれに有意差が認められないことから必ずしも全長10.2mmからの投与が全長16.7mmからの投与より有効とは言えない。したがって本研究の投与条件でアユの性転換を図る場合にはふ化36日後（全長16.7mm）までに 17α -MTの投与を開始すればよいと考えられる。

一般にホルモンの投与は形態的性分化が完了するまで継続しなくてはならないと言われている。¹⁵⁾ アユにおける形態的性分化期は、卵巣への分化を示す減数分裂前期の生殖細胞（卵母細胞）の出現、卵巣薄板構造を指標にして明らかにされているが、形態的な精巣への分化については記載されていない。¹⁶⁾ メダカ¹⁶⁾ やニジマス¹⁷⁾ では精母細胞への分化は卵母細胞に比べて遅いことが知られており、アユについても同様である可能性がある。本試験の結果より、アユでは卵巣への分化が完了する時期以後も 17α -MTの投与を継続する必要があることが明らかになった。これはおそらく精巣への分化の完了が卵へのそれに比べて遅いことに起因すると推察される。河本¹⁶⁾はメダカのMT処理による雄への性転換過程において一時的に卵母細胞が分化し、その後退化して精巣へと分化する過程を観察している。同様の経過がティラピア⁸⁾、ニジマス¹⁸⁾においても観察されている。このような報告を考慮すると、アユにおける卵巣への分化期後の処理は、精巣への分化が完了するまで、卵母細胞の増殖を抑制し退化を促すために必要であると推察される。本研究における最も遅い 17α -MTの投与終了は、試験2のふ化後204日（全長90mm、体重5g）であるが、雌と

判定された個体の中には、さらに 17α -MTの投与を続けることによって雄化するのではないかと推察されるような個体（精巣に似た形の卵巣を持つ）が多数含まれており、性転換に最適な 17α -MTの投与終了時期はさらに遅い可能性がある。高橋は、 17α -MTの投与終了時期が遅いほど不稔魚の出現率が高まることを報告している。¹⁹⁾本研究結果も同様であり、最適投与終了時期は性転換と不稔化との兼ね合いによって決まると言えられ、今後さらに検討する必要がある。

高橋は、高濃度の 17α -MT添加飼料（ $5 \sim 15 \mu\text{g/g} \cdot \text{diet}$ ）を全長20.1mmから80~90日間投与することによってアユの性転換雄が得られたと報告している。^{7, 8)}一方、低濃度の 17α -MT添加飼料の投与について検討した本試験では、長期間（最大186日間）の投与が有効であった。渡邊らは異なる濃度の 17α -MT溶液に浸漬することによってコイの性転換条件を検討し、濃度が低いほど長期間の処理が有効であることを報告している。²⁰⁾同様に岡田はニジマスについて 17α -MTの濃度によって投与時期に差が生じる可能性を指摘している。¹⁾ 17α -MTの投与期間に関する本試験と高橋の有効投与期間との相違は飼料への 17α -MTの添加濃度の違いによると考えられる。

辻村ら⁵⁾、高橋⁷⁾は、大部分の性転換雄の生殖腺は片方のみ発達しており、輸精管の形成異常によって精液の排出が出来ないことを報告している。本試験の結果も彼らと同様であった。さらに本試験では発達する生殖腺がほとんど左葉であったが、対照区の魚には左右の生殖腺が認められたため、これは 17α -MTの投与の影響と考えられる。他魚種ではこのような事例はないが、雌雄同体の生殖腺が前方と後方で異なる事例が報告されている。^{3, 21)}これについて中村³⁾は、生殖腺の性分化が前方と後方で時間的に異なる可能性を指摘している。アユの生殖腺は左葉が右葉より大きく、左葉は前方が右葉は後方が発達することを考慮すると、アユでは右葉の性分化が左葉より時間的に遅い可能性がある。このような場合、早期の 17α -MTの投与が不稔化を誘導するため、右葉のみの不稔化が生じ得ると考えられる。

試験2の1区と2区の雌雄同体魚を含む性転換雄の出現率は25%以上であった。それらの性転換魚には、輸精管形成異常によって直接精液を排出できないという問題があるが、アユの精巣内精子は人工精漿中に培養することによって利用する事が出来る。²²⁾田口は重量換算で50倍希釈した精巣内精子を卵に媒精した場合でも対照区に匹敵する発眼率（80%以上）が得られることを報告して

いる。²³⁾著者らは実際にこの技術を使って雌雄同体魚の精巣を培養し問題なく全雌魚の作出を行っている。²⁴⁾希釈精液の媒精は卵の1/10量で充分であり、1gの精巣があれば計算上500g（およそ150万粒）の卵に媒精できる。従って、本試験で得られた性転換雄の出現率は充分実用化可能なレベルであり、今後は作出率の安定化を目指し本試験の再現性を確認する必要があると考えられる。

要 約

1. 全雌生産に不可欠なアユの性転換雄を効率的に作出するために 17α -MT添加飼料の投与開始時期及び投与終了時期について検討した。
2. ふ化36日後より投与を開始した区の性転換率はふ化56日後より開始した区のそれより有意に高く、 $0.4 \mu\text{g/g} \cdot \text{diet}$ の 17α -MT添加飼料を給餌し性転換を図る場合には、ふ化36日後（全長16.7mm）までに投与を開始すれば良いことが明らかになった。
3. 17α -MTの投与終了時期が遅いほど性転換雄の出現率が高まる傾向があり、 $0.4 \mu\text{g/g} \cdot \text{diet}$ の 17α -MT添加飼料を給餌し性転換を図る場合には、雌への性分化完了後も長期（ふ化204日後）に渡って 17α -MTを投与する必要があることが明らかになった。
4. 性転換雄の生殖腺は左葉のみ発達している事例が多く、輸精管の形成は不完全であり、精液を排出することは出来なかった。
5. 長期間 17α -MTを投与した区では性転換雄の出現率が25%以上となり、全雌アユの実用化に目途が立った。

文 献

- 1) 岡田鳳二, 1985; ニジマスの人為的性統御に関する研究. 北海道立水産孵化場研究報告, 40, 1-49.
- 2) 田口 博, 1989; アマゴの全雌生産とその特性. 水産育種, 14, 11-22.
- 3) 中村 将・岩橋 正男, 1982; ティラピア *Tilapia nilotica* の雄性ホルモン処理による雄化の実用化試験. 日水誌, 48(6), 763-769.
- 4) Matumoto, K. 1997; Governmental research funding and policy for biotechnology in aquaculture

- lture. Bull. Nalt. Inst. Aquacult. ,suppl.3, 69-71.
- 5) 辻村明夫・堀江康浩・畠下成穂, 1992 ; アユの全雌生産に関する検討. 平成元年度和歌山県内水面漁業センター事業報告, 15, 4-7.
- 6) 辻村明夫・宇野悦央・松本全弘, 1994 ; アユの全雌生産に関する検討. 平成3年度和歌山県内水面漁業センター事業報告, 17, 1-3.
- 7) 高橋昭夫, 1995 ; 淡水魚類の雌性化技術開発 ホルモンによるアユの性転換－VII ホルモン投与量、投与期間と性転換魚の作出との関係. 神奈川淡水試報, 31, 1-3.
- 8) 高橋昭夫, 1996 ; 淡水魚類の雌性化技術開発 ホルモンによるアユの性転換－IX ホルモン投与量 投与期間と性転換魚の作出との関係. 神奈川淡水試報, 32, 1-3.
- 9) 桑田知宣, 1998 ; 性転換雄アユの作出とその利用による全雌アユの作出について. 平成8年度岐水試業報, 18.
- 10) 辻村明夫・堀江康浩・松本全弘, 1992 ; アユの全雌生産に関する検討. 平成2年度和歌山県内水面漁業センター事業報告, 16, 4-7.
- 11) 高橋昭夫, 1995 ; 淡水魚類の雌性化技術開発 全雌アユの作出に関する研究. 神奈川淡水試報, 31, 7-11.
- 12) 高橋昭夫, 1996 ; 淡水魚類の雌性化技術開発 全雌アユの作出に関する研究－2. 神奈川淡水試報, 32, 4-5.
- 13) 中村 将, 2000 ; 魚類の性分化と生殖に関する内分泌学的研究. 日水誌, 66(3), 376-379.
- 14) Nakamura, M. 1994 ; A study of susceptibility of sex reversal after a single 2-hour treatment of androgen in amago salmon. Fisheries Sci. 60(4), 483-484.
- 15) 佐々木拓, 隆島史夫, 高橋昭夫, 1987 ; アユの性分化とその制御. 水産増殖, 34(4), 249-257.
- 16) 河本典子, 1973 ; 性ホルモン投与によるメダカ生殖巣の性分化の転換過程の形態学的観察, 動物学雑誌, 82, 29-35.
- 17) Takashima, F. R. Patino, and M. Nomura, 1980 ; Histological study on the sex differentiation in rainbow trout. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 46(11), 1317-1322.
- 18) 隆島史夫, 1992 ; 全雌魚生産技術の開発 性転換機構の解明 魚類の雌性発生等による育種技術の開発. 農林水産技術会議事務局 研究成果 267, 61-64.
- 19) 高橋昭夫, 1993 ; 淡水魚類の雌性化技術開発 ホルモンによるアユの性転換－VI ホルモン投与量、投与期間と性転換魚の作出との関係. 神奈川淡水試報, 29, 1-4.
- 20) 渡邊直樹・岩崎順・高島葉二, 1997 ; 17 α -メチルテストステロン浸漬法によるコイ *Cyprinus carpio* の性転換雄作出について. 茨城内水試研報, 33, 53-59.
- 21) Yamamoto, T. 1958 ; Artificial induction of functional sex-reversal in genotypic females of the Medaka (*Oryzias latipes*). J.Exp.Zool., 137:227-263.
- 22) 岡崎稔・熊崎博, 1995 ; 人工精漿によって希釈した精液の有効性. 同誌, 40, 7-10.
- 23) 田口錠次, 1998 ; 精巣内精子の有効性について. 平成8年度岐水試業報, 11.
- 24) 桑田知宣, 1999 ; 性転換雄アユの作出とその利用による全雌アユの作出について－II. 平成9年度岐水試業報, 12.