

# メチルテストステロン投与がアユの雌から雄への性転換に与える影響

## 生殖腺の組織学的観察

桑田知宣<sup>\*1</sup>, 劉 雁輝<sup>\*2</sup>, 古屋康則<sup>\*3</sup>

Effects of  $17\alpha$ -methyltestosterone administration on sex-reversal from genetically female to functionally male in ayu, *Plecoglossus altivelis altivelis*

Histological observation of gonadal tissue.

TOMONORI KUWADA<sup>\*1</sup>, YAN-HUI LIU<sup>\*2</sup>, AND YASUNORI KOYA<sup>\*3</sup>

メダカ *Oryzias latipes* で性ホルモン処理により人為的性転換の誘導が起きることが証明されて以来、<sup>1)</sup>性の統御により商業的付加価値が付くような多くの魚種において、機能的な人為性転換が試みられてきた。<sup>2,3)</sup> アユ *Plecoglossus altivelis altivelis* では卵巣が発達した雌、いわゆる「子持ちアユ」が、通常のものに比べて商品価値が高く、高値で取引されるため、養殖の現場においては、雌のみの生産が望まれている。このため、養殖アユの全雌化に関する研究は二十年以上前から行われてきた。近年、性ホルモンを利用したアユの性転換雄の作出について多数の報告がなされ、<sup>4-11)</sup> 性転換雄の精子（全てが X 精子となる）を利用することにより全雌を作出できることが報告されている。<sup>5, 8, 9, 11-14)</sup> しかし、性転換雄の作出率は、最も高い場合でも 3 割程度にとどまり、未だに遺伝的雌から機能的雄への効率的な性転換手法は確立されていない。性転換雄の作出条件について検討したこれらの報告では、アユの組織学的な性分化期<sup>15)</sup> を含むように、様々な濃度の  $17\alpha$ -メチルテストステロン（以下 MT）処理が行なわれている。それにも関わらず、雄への高率的な性転換条件が見出されない上に、いずれの処理条件においても、雄以外に雌や不稔魚が高率で出現する。効率的に性転換雄を作出するためには、このような性転換状況の個体差を抑制し一様に雄への性転換が誘導されるような方法を開発する必要がある。しかし、このような個体差が MT 処理過程のいつから生じるのか、また、処理終了時の生殖腺の状態と最終的な性転換結果との間にはどのような関連があるのかについては明らかにされていない。そこで本研究では、全雌個体群を用いて MT 処理を行ない、MT 処理を段階的に終了して各処理群の性転換について調査するとともに、各処理群の MT 処理終了時の生殖腺を組織学的に観察することにより、MT 処理終了時の生殖腺の状態と最終的な性転換結果との関連を調べた。

キーワード：アユ、全雌、性転換、生殖腺、組織学

\*<sup>1</sup> 岐阜県河川環境研究所

\*<sup>2</sup> 岐阜大学大学院教育学研究科

\*<sup>3</sup> 岐阜大学教育学部

## 方 法

### 実験魚

本研究に用いたアユは、当所で2000年11月1日にふ化した全雌群である。ホルモン処理した魚（試験群）とホルモン処理していない対照群を用いた生殖腺の組織学的観察を行った（第1表）。試験群には、ふ化後14日目（全長土標準偏差： $8.0 \pm 0.7$  mm）からMT添加飼料（ $0.4 \mu\text{g/g}$ ）を経口投与した。ふ化131日、159日、182日、216日、239日後に、それぞれMT投与を中止し、その後は通常の飼育を継続した。MT投与終了時に無作為に採集した個体について全長を計測した後、生殖腺組織の観察を行った。また、対照群については、ふ化後131日、159日、および182日後に無作為に採集し、生殖腺の組織観察をおこなった。

第1表 各試験区のMT処理スケジュールと組織観察個体数

実験群	採取&MT処理終了日（ふ化後日数）	MT処理期間	観察個体数
試験群	2001年3月12日（131日）	117日	5
	2001年4月9日（159日）	145日	5
	2001年5月2日（182日）	168日	6
	2001年6月5日（216日）	202日	7
	2001年7月29日（239日）	225日	14
	対照群	2001年3月12日（131日）	—
	2001年4月9日（159日）	—	3
	2001年5月2日（182日）	—	3

### 組織観察

ブアン氏液で固定した各群のサンプルの中から、3-14個体を無作為に取り出した。解剖しても生殖腺の識別が困難な小型の試料については生殖腺を含む軸幹部全体を、解剖により生殖腺の識別が可能な大型の試料については生殖腺を摘出して、それぞれ常法によりパラフィンに包埋し、 $6 \mu\text{m}$ の連続横断切片を作成した。切片にヘマトキシリニアエオシンの二重染色を施し、光学顕微鏡で観察した。

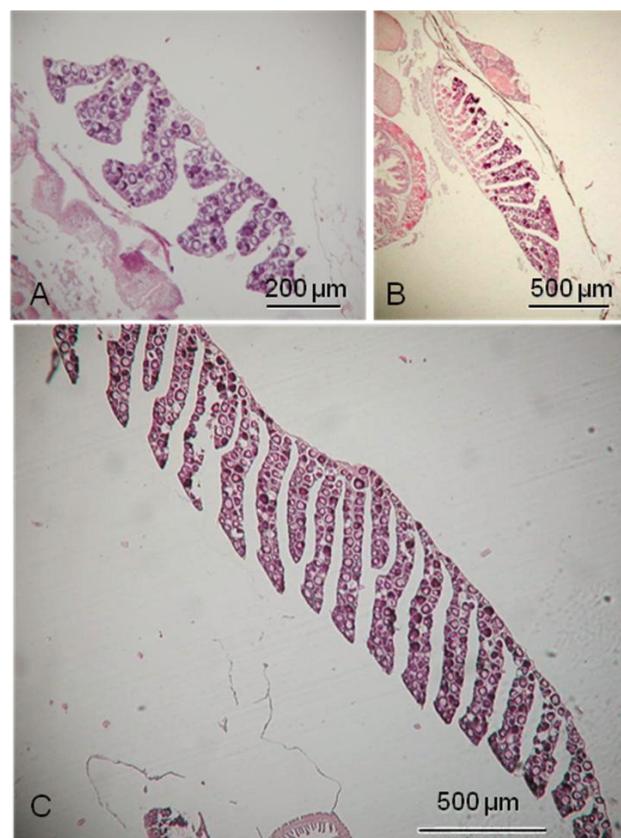
### 個体の性の確認

対照群および試験群の残りの魚については、産卵期まで飼育を継続し、生残した全ての供試魚を開腹して生殖腺を肉眼で観察した。個体の性を生殖腺の状態から、卵巣を持つ「雌」、卵巣組織と精巢組織が混在する「雌雄同体」、精巢を持つ「雄」、および発達した生殖腺を持たない「不稔」の4つに分類した。

## 結 果

### 生殖腺組織

対照群では、ふ化後の日数の経過とともに、卵巣の発達が認められた。いずれの区においても周辺仁期の卵母細胞のみが見られた。ふ化後の日数の経過に伴って、卵母細胞



第1図 メチルテストステロン未処理の雌アユ（全雌群）の生殖腺の組織像

- A) ふ化131日後の生殖腺
- B) ふ化159日後の生殖腺
- C) ふ化182日後の生殖腺

の直径は増大し、対照群のふ化131日、159日、182日後の卵母細胞の平均直径はそれぞれ $25.8$ 、 $37.4$ 、および $40.4 \mu\text{m}$ であった。試験群ではいずれの観察個体においても精巢組織は認められず、発達の悪い卵母細胞を含む卵巣組織のみが観察された。ふ化131日後の試験群（採集時の全長 $55.1 \pm 5.2$  mm）の生殖腺は同時期の対照群のそれに比べて小さく、その中には極めて少数の周辺仁期の卵母細胞が見られるのみで、卵巣薄板の形成が認められなかった（第2図A）。卵母細胞の直径は平均 $10 \mu\text{m}$ で、同時期の対照群に比べ小さかった。また、退行途上と思われる卵母細胞が見られた（第2図A、矢印）。ふ化159日後の試験群（採集時の全長 $69.7 \pm 6.8$  mm）の生殖腺は同時期の対照群に比べ小さかった。観察した5個体のうち4個体では

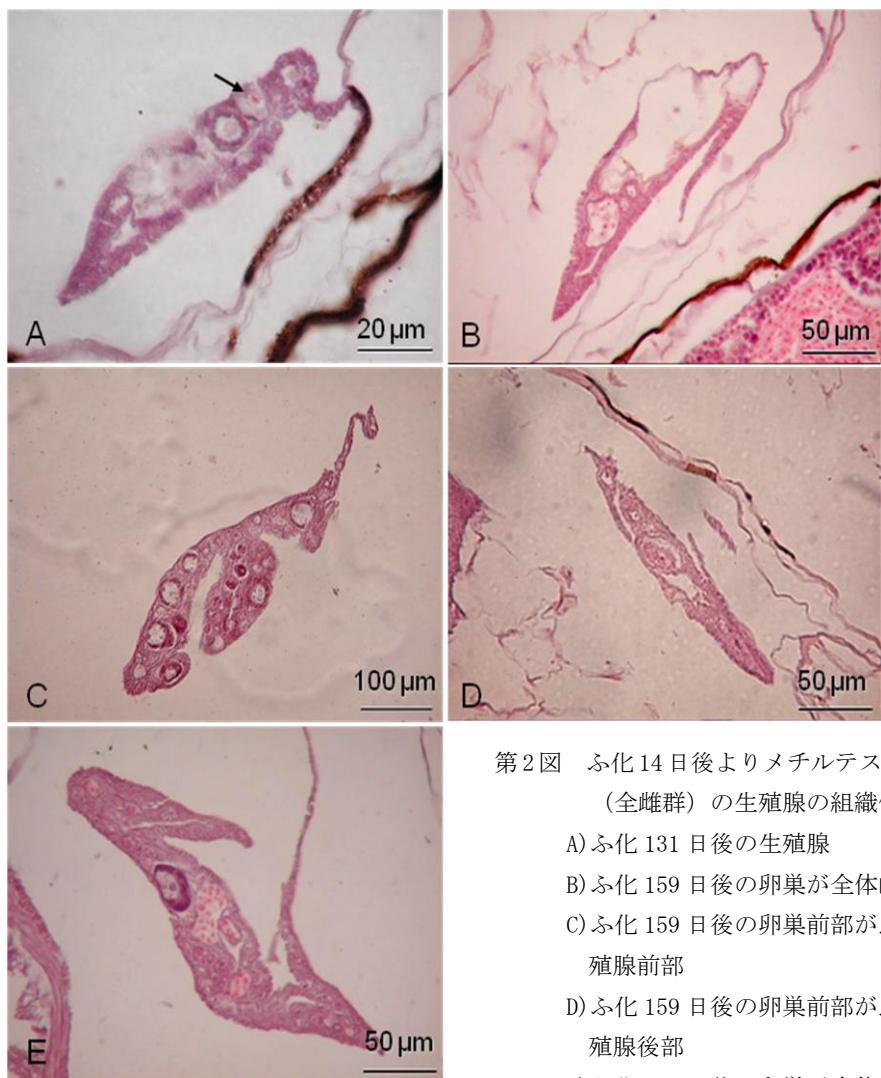
卵巣が全体的に退行し、ふ化 131 日後の試験群との違いがほとんど見られなかった（第 2 図 B）。1 個体の卵巣では前部が比較的正常な状態で発達し、卵巣薄板が認められた（第 2 図 C）。しかし、卵母細胞の平均直径は 29  $\mu\text{m}$  で、同時期の対照群のものより小さかった。卵巣の中部から後部にかけては組織が退行して細くなり、卵母細胞がほとんど認められなかつた（第 2 図 D）。

ふ化 182 日後の試験群（採集時の全長 76.6  $\pm$  5.5 mm）の卵巣ではふ化 159 日後の試験群と同様に 2 つの型に分けられた。1 つの型では卵巣組織が全体的に退行し、卵母細胞は前・中部で僅かに見られるのみで（第 2 図 E）、中・後部ではほとんど見られなかつた。この型は 6 個体中 4 個体で見られた。もう 1 つの型は残りの 2 個体で見られ、生殖腺の前部が比較的正常な状態で発達し、卵母細胞の平均直径も 39.2  $\mu\text{m}$  で同時期の対照群とほぼ同じであり、そのうち 1 個体では卵巣薄板が認められた（第 3 図 A）。しかし、中部より後方では退行して細くなり、卵母細胞がほ

とんど認められなかつた（第 3 図 B）。

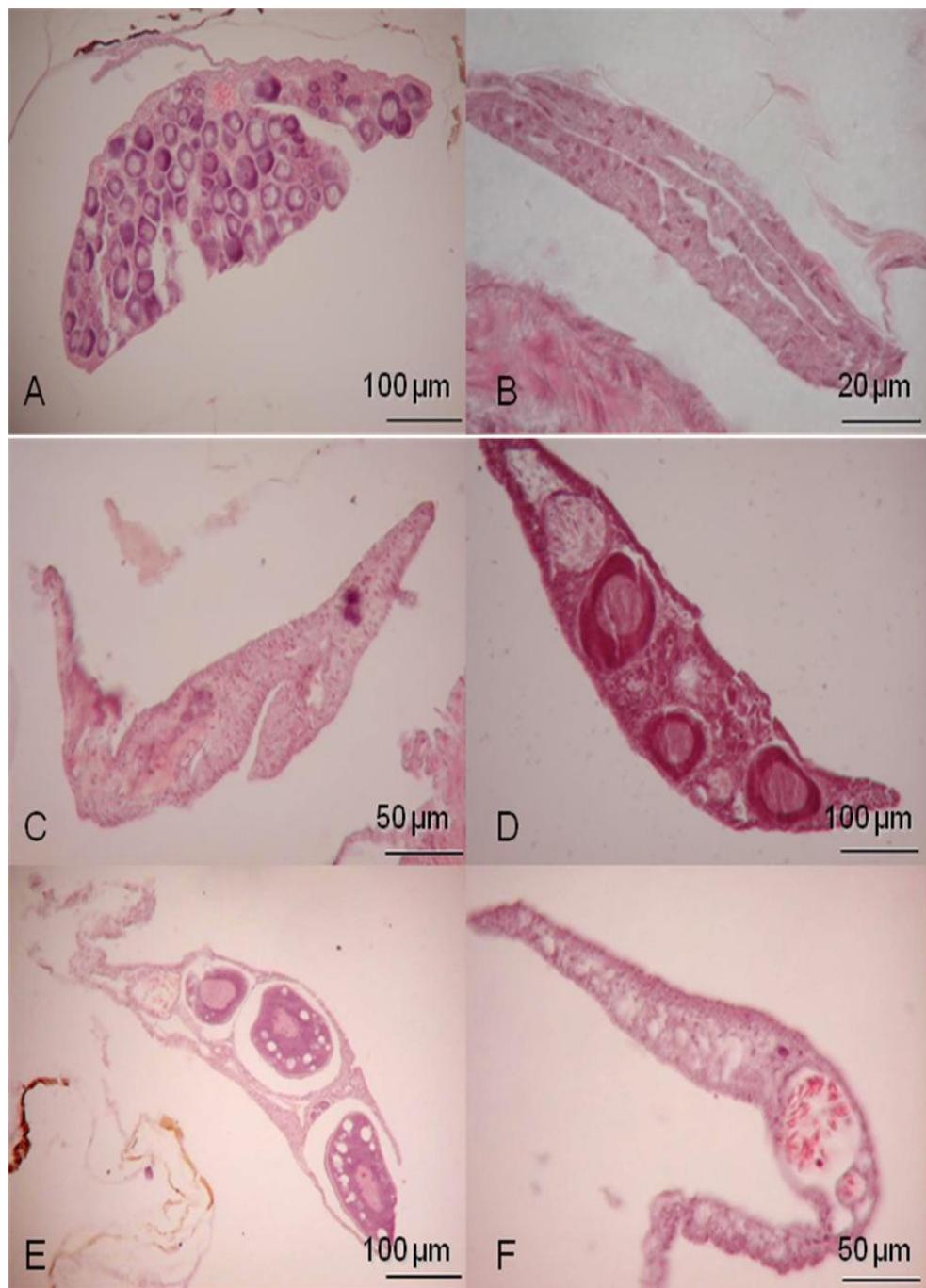
ふ化 216 日後の試験群 4 区（採集時の全長 90.0  $\pm$  6.8 mm）では卵巣自体の大きさは増大したが、多くの個体では数個の退行した卵母細胞が見られたのみであり（第 3 図 C）、2 個体でのみ直径 38–50  $\mu\text{m}$  の周辺仁期の卵母細胞が見られた（第 3 図 D）。いずれの場合においても卵巣薄板は見られず、卵母細胞の数は少なかつた。

ふ化 239 日後の試験群（採集時の全長 109.9  $\pm$  7.8 mm）では観察した 14 個体のうち 3 個体で卵黄胞期の卵母細胞を持っていた（第 3 図 E）。卵母細胞の直径は 90–150  $\mu\text{m}$  であり、細胞質が増大し、ヘマトキシリンで濃染された。卵膜に接して薄い濾胞細胞が認められた。しかし、卵巣自体の大きさは小さく、卵巣薄板は認められなかつた。残りの 11 個体では生殖腺が退行し、生殖腺の前部にのみ極めて少数の退行したと思われる周辺仁期の卵母細胞、あるいはヘマトキシリンで濃染される仁様の構造物が認められた（第 3 図 F）。



第 2 図 ふ化 14 日後よりメチルテストステロン処理を受けた雌アユ（全雌群）の生殖腺の組織像

- A) ふ化 131 日後の生殖腺
- B) ふ化 159 日後の卵巣が全体的に退行した個体の生殖腺
- C) ふ化 159 日後の卵巣前部が比較的正常に発達した個体の生殖腺前部
- D) ふ化 159 日後の卵巣前部が比較的正常に発達した個体の生殖腺後部
- E) ふ化 182 日後の卵巣が全体的に退行した個体の生殖腺前部



第3図 ふ化 14 日後よりメチルテストステロン処理を受けた雌アユ（全雌群）の生殖腺の組織像

- A) ふ化 182 日後の卵巣前部が比較的正常に発達した個体の生殖腺前部
- B) 同一個体の生殖腺後部
- C, D) ふ化 216 日後の生殖腺
- E, F) ふ化 239 日後の生殖腺

#### 産卵期の性の分布

MT 処理された試験群を産卵期に解剖した際の生殖腺の性の状態を第2表に示した。雄への性転換率は MT 処理期間が長いほど高くなつたが、最も長い区においてもその率

は 9.3%にとどまつた。また、不稔魚の出現率は雄の出現率よりもはるかに高く、また、MT 処理期間が長いほど高くなる傾向が認められた。

第2表 産卵期における各区の個体の性

実験群	MT処理期間	雄	雌雄同体	雌	不稔	雄化率(%) <sup>*1</sup>	不稔化率(%) <sup>*2</sup>
試験群	117日	1	5	194	31	0.4	13.4
	145日	4	3	132	182	1.2	56.7
	168日	14	5	74	205	4.7	68.8
	202日	14	3	36	289	4.1	84.5
	225日	34	5	29	298	9.3	81.4
対照群	—	0	0	421	1	0.0	0.2

<sup>\*1</sup> 雄化率は(雄個体数/調査尾数)×100<sup>\*2</sup> 不稔化率(不稔個体数/調査尾数)×100

## 考 察

生殖腺組織の観察から、MT処理を行った試験群では、对照群に比べて卵巣発達あるいは卵母細胞の成長が著しく抑制されていることを確認した。MT処理による卵巣及び卵母細胞の成長抑制、退行は、メダカ、ニジマスにおいても報告されている。<sup>16, 17)</sup>今回の観察では、試験群の全ての観察個体において卵巣発達に関する何らかの遅れや抑制状態が確認された。このことは、今回のMT処理が全ての個体に何らかの影響を与えていたことを示している。しかし、卵巣発達の抑制の程度は、全体的に退行傾向を示す個体が存在する一方で、卵巣の前部が比較的正常に発達する個体が存在するなど同一処理区内においても個体差が認められた。アユのMT処理群を産卵期まで養成すると、雄のほかに、雌、雌雄同体、不稔魚が出現する。<sup>4-11)</sup>このような性転換状況の個体差がいつから生じるのかについては不明であったが、本試験により、少なくともMT投与処理の終了時点の生殖腺の状態にはすでに個体差があることが明らかになった。

産卵期における性比調査では、試験群の全ての区に雄化個体が出現したにもかかわらず、処理終了時の組織学的観察では、いずれの区にも精母細胞への分化および精巢組織を有する個体を確認できなかった。メダカの通常雄では、全長11mmに達すると精原細胞が精母細胞へと分化し精巢が発達する。そして、遺伝的雌のメダカにおいても、MT処理を施された場合、通常雄と同時期に精母細胞への分化が確認できるようになる。<sup>16)</sup>これに対して、アユの雄で精母細胞への分化が確認されるのは、産卵時期が早い琵琶湖産アユの場合でも7月以降である。<sup>18)</sup>従って、試験群のアユは、ふ化239日後(6月29日)においても精母細胞への分化時期に達していなかった可能性がある。また、組織学的な精巢への分化指標として輸精管の形成がよく用いられるが、性転換雄アユは輸精管が正常に形成されないため、<sup>4, 8, 10)</sup>それを指標に出来ない可能性もある。この

ようなことが重なり、本試験では精巢への分化を組織学的に確認できなかつたものと推察される。本試験によって、MT処理終了時の生殖腺の状態にはすでに個体差があることが明らかになった。しかし、MT処理終了後に、それの中からどのように精巢組織が発達するのかについては明らかに出来なかつた。今後は、MT処理終了後の試験魚の生殖腺発達を追跡調査する必要がある。

本試験ではMT処理期間が長い区ほど不稔化率が高まり、MT処理期間が200日を超えたMT処理区では、不稔化率は8割以上に達した。前述のように、MT処理は卵巣の発達を抑制し卵母細胞の退行を促進すること、この影響で処理終了時にごくわずかな生殖細胞しか持たない個体が多数出現することから、これらの不稔魚の出現原因はMTの過剰投与であると考えられる。一方、いずれのMT処理区にも雌が出現した。雌は、MT処理の不足だけではなく、過剰投与の場合にも出現する可能性があるが、処理期間の短い区ほど雌の出現率が高くなることから、少なくとも処理期間が短い1区または2区の雌出現原因は、主に投与不足であると考えられる。しかし、1区、2区には同時に不稔魚も出現することから、同一処理区内に投与不足もしくは投与過剰と考えられる個体が同時に存在することになる。アユの雌から雄への性転換については、今までに様々な投与濃度が検討され、0.4~20μg/g dietという広範囲の投与濃度において性転換雄アユの作出が報告されているが、性転換雄アユ作出率は、最も高い事例でも3割程度であり、多くは数%にとどまることが多い。<sup>4-11)</sup>また、いずれの報告においても雄以外に雌や雌雄同体、不稔魚の出現が報告されている。<sup>4-11)</sup>同様に、MT処理濃度を固定し、投与期間を117日間~225日間まで広範囲に検討した本試験においても、全ての区に雄の出現が認められる一方で、雄化率は最も高い区でも9.3%にとどまり、しかも、全ての区に雌や雌雄同体、不稔魚が出現した。このように性転換雄アユの出現するMT処理条件は、投与濃度、投与期間とともに広範である一方で、いずれの条件においても性転換雄を高率で誘導できない。このような事実は、MT処理によって生じるアユの性転換が個体差に大きく影響されるような極めて不安定な現象であることを示している。従って、MT処理方法の改善によって飛躍的に性転換率を向上させるのは困難なのかもしれない。今後はMT処理以外の性転換手法について検討する必要があると考えられる。アユの生殖腺の性分化時期はふ化後80~100日目の間、全長31~35mmの間にあることが示されている。<sup>15)</sup>今後、この情報に基づいて、ホルモン合成阻害剤などの投与効果について検討する必要がある。

## 要 約

1. 全雌アユにふ化後 14 日目から性分化期（ふ化後 80–100）を通して様々な期間 0.4 µg/g · diet の MT 添加餌料を給餌した際の生殖腺の状態を組織学的に観察した。
2. MT 处理群（処理期間：115–225 日）は対照群に比べて MT 处理期間中の卵巣の発達が著しく抑制され、その抑制状態には個体差が認められた。MT 处理期間中（ふ化 23 9 日後）のどの時期においても、精巣への分化を組織学的に確認することはできなかった。
3. いずれの MT 处理群にも、産卵期には雄、雌雄同体、雌、不稔魚が出現し、MT 处理による性転換結果は個体によって異なっていた。
4. MT 处理期間が長くなるに従って雄化率は増加したもの、最高でも 9.3% にとどまった。これに対して不稔魚の出現率は MT 处理により著しく増加し、80% 以上の個体が不稔となった。
5. MT 处理によるアユの性転換は、個体差に大きく影響されるような極めて不安定な現象であると考えられるため、今後は MT 处理以外の性転換手法について検討する必要があると考えられる。

## 文 献

- 1) Yamamoto K. Artificial induction of functional sex-reversal in genotypic females of the medaka (*Oryzias latipes*). *J. Exp. Zool.* 1958; 137, 227–264.
- 2) 隆島史夫, 会田勝美. 魚類の性分化とホルモン. 「性分化とホルモン」（日本比較内分泌学会編）学会出版センター, 東京. 1984; 77–97.
- 3) 山崎文雄. 魚介類における単性養殖の基礎. 月刊海洋 1999; 31: 253–259.
- 4) 辻村明夫, 堀江康浩, 畑下成穂. アユの全雌生産に関する検討. 平成元年度和歌山内漁セ事報 1991; 15: 4–7.
- 5) 辻村明夫, 宇野悦央, 松本全弘. アユの全雌生産に関する検討. 平成 3 年度和歌山内漁セ事報 1993; 17: 1–3.
- 6) 高橋昭夫. 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—I, 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 1995; 31: 1–3.
- 7) 高橋昭夫. 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—II, 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 1996; 32: 1–3.
- 8) 高橋昭夫. 染色体操作による全雌三倍体アユの作出と飼育特性. 神奈川水研セ研報 1998; 3: 96–77.
- 9) 桑田知宣. 性転換雄アユの作出とその使用による全雌アユの作出について. 平成 8 年度岐阜水試事報 1998; 18.
- 10) 桑田知宣, 大仲知樹, 一柳哲也, 荒井真. 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. 岐淡水研報 2001; 46, 9–15.
- 11) 桑田知宣. 全雌アユ種苗の量産技術の開発とその実用化の現状. 海洋と生物 2008; 178: 664–669.
- 12) 辻村明夫, 堀江康浩, 松本全弘. アユの全雌生産に関する検討. 平成 2 年度和歌山内漁セ事報 1992; 15: 4–7.
- 13) 高橋昭夫. 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 1995; 31: 7–11.
- 14) 高橋昭夫. 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—II. 神奈川淡水試報 1996; 32: 4–5.
- 15) 劉雁輝, 桑田知宣, 古屋康則. アユ *Plecoglossus altivelis altivelis* の生殖腺の性分化過程. 魚類学雑誌 2008; 55: 95–104.
- 16) 河本典子. 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 1973; 82: 29–35.
- 17) 隆島忠夫. 第 2 章全雌魚生産技術の開発 1, 性転換機構の解明, (1) 性分化安定種の性分化機構の解明と性統御, ウニ雄の生殖腺. 魚介類の雌性発生等による育種技術の開発（研究成果 267）, 農林水産技術会議事務局, 東京. 1992; 61–63.
- 18) 本間義治, 田村栄光. ビワ湖産コアユの生殖腺における周年変化. 魚類学雑誌 1962; 9: 135–152.