

全雌サクラマスの子メチルテストステロン投与 による機能的性転換雄作出について

宮崎 統五・大津 順

(1990年11月29日受理)

Functional Masculinization of Genetic Females in Masu Salmon,
Oncorhynchus masou, by Administration of Methyltestosterone

Tougo MIYAZAKI*¹⁾ and Jun OHTSU*²⁾

In order to induce functional masculinization in masu salmon, *Oncorhynchus masou*, dosage and interval of methyltestosterone (MT) administration was investigated. After hatching out, MT dissolved in ethanol was added to the tank, which kept all female alevins, at concentrations of 0.001, 0.01, 0.1, and 1.0 mgMT/ℓ water with 0-, 2-, 5-, 11- and 23-day intervals respectively until swim up for 35 days. Then they were fed with diet contained 1mgMT/kg diet for 60 days. At 12 months, group dipped in 0.01mg/ℓ with five-day interval was shown the highest functional male rate of 33.3%. At 24 months, the rate was 100.0% in 0.001mg/ℓ with two-day interval group, 0.01mg/ℓ with five-day group, and 0.1 mg/ℓ with eleven-day group, respectively. The results indicated that the most adequate concentration to induce functional masculinization is 0.01mg/ℓ MT with five-day interval in *O. masou*.

Key words: dipping interval, masu salmon, methyltestosterone, masculinization,
Oncorhynchus masou.

サクラマス (*Oncorhynchus masou*) は極東の特産種であり、市場価値も高く、漁業の対象種として重要な位置を占めているが、近年資源の減少が著しく、その資源増大が望まれている。サクラマスの雄は河川に残留する傾向が強いのに対して、雌の大部分はスモルト化し降海する。サクラマスの資源増大を図るには、雌の幼魚を放流用種苗として大量に生産する技術を確立しなければならない。

一方、最近性のコントロールや育種を目的とした染色体操作の研究が進み、これらの成果を産業的に重要なサケ科魚類の増養殖事業に応用し、生産性を向上させるための実用化

*¹⁾ 富山県栽培漁業センター (Toyama Prefectural Sea Farming Center, Himi, Toyama 935-04, Japan)

*²⁾ 富山県水産試験場 (Toyama Prefectural Fisheries Experiment Station, Namerikawa, Toyama 936, Japan)

研究が行われている。性のコントロール技術としては、遺伝的には雌 (XX) である個体をホルモン処理により表現型を雄とし、この性転換雄の精子を用いて交配を行うとその子はすべて雌となる全雌生産法が確立されている (岡田 1989)。

この方法をサクラマスに応用するためには、性転換雄を作出するためのホルモンの投与方法が問題となる。これまでに、本種においてはふ化後から浮上期まではメチルテストステロン (以下 MT) を浸漬法により投与し、浮上直後から60日間はMTを配合飼料 1 kg 当り 1 mg 添加して経口投与すると雄化する個体が現れることが明らかとなっている (宮崎 1988)。しかし、浸漬法において最も効率的に性転換雄を作出するための最適投与濃度及び最適投与間隔は未だ明らかになっていない。そのため、本研究は、サクラマス性転換雄を作出するための、MT投与の最適濃度及び最適間隔を明らかにすることを目的として実施した。

材 料 と 方 法

供試魚として、本試験場で養成した性転換雄サクラマスから得た精液を用い、神通川産雌サクラマスから得た卵に媒精して稚魚を作出し、ふ化直後から試験に用いた。飼育には 7 l 水槽を用い、供試魚58尾ずつを各水槽に収容し、1分間当り1.5 l の飼育水 (約13℃) を注水した。

MT (シグマ社) はエタノールに溶解して希釈し、MTの飼育水中の濃度が 0.001, 0.01, 0.1および1.0mg/l となるように、希釈したMTのエタノール溶液それぞれ50mlを蒸留水に加えて1 l とした希釈水溶液 (MT濃度 3.6-3600mg/l) を作成し、ふ化直後から浮上までの約35日間0, 2, 5, 11および23日の間隔を設けて希釈水溶液を1時間当り25ml, 1日2時間マイクロチューブポンプにより飼育水に滴下した。対照区として、エタノール濃度が他の区と同じ量となるようにエタノールの希釈水溶液を滴下した。浮上直後から60日間は実験区にはMT 1 mg/kg dietの配合飼料を、対照区にはMTを添加しない配合飼料を投与した。

対照区の供試魚は、ふ化後6ヶ月の時点で全個体を取り上げ、開腹して生殖腺の形状を肉眼で観察した。

各試験区の供試魚は、体重が約2g以上となった時点でビット式タグを腹腔内に挿入して個体識別を行い、混養して飼育した。その後約12ヶ月令となった時点で供試魚の腹部を圧迫して排精する個体の割合を調べた。その後通常に飼育し、約24ヶ月令となった時点で供試魚の腹部を圧迫して排精する個体の割合を調べると共に、排精しなかった個体を開腹して、生殖腺の状態を肉眼で観察した。また、3, 12及び24ヶ月令の時点で生残数を調べた。

結 果

Table 1に約12ヶ月令までの試験の結果をに示した。対照区の供試魚を6ヶ月の時点で開腹して調べた結果、すべて雌であることが確認された。

浸漬濃度が0.01mg/l 以上の場合に濃度の上昇及び浸漬間隔の短縮にしたがって3ヶ月令の時点での生残率が低下する傾向が認められた。約12ヶ月令の時点での生残率は事故によ

る個体数の減少がみられた群を除いては大きな変化は認められなかった。

約12ヶ月令の時点における生残魚数に対する排精個体数の割合は低濃度の場合は浸漬間隔が短い群で、高濃度の場合は浸漬間隔が長い群で高い傾向がみられ、MT0.001mg/l浸漬2日間隔群で27.8%、0.01mg/l浸漬5日間隔群で33.3%、0.1mg/l浸漬11日間隔群で25.0%、1mg/l浸漬23日間隔群で30.8%であった。しかし、他の群ではこれらよりかなり低かった。また、供試全数に対する排精個体数の割合は、0.01mg/l5日間隔群で10.3%であったが、他の群ではいずれも10%以下であった。

Table 2に約24ヶ月令の時点での試験の結果をに示した。生残率は25.9%以下であったが、浸漬濃度が高いほど生残率が低い傾向が認められた。生残魚数に対する排精個体数の割合はMT0.001mg/l浸漬2日間隔群、0.01mg/l浸漬5日間隔群および0.1mg/l浸漬11日間隔群ではそれぞれ100.0%、0.001mg/l浸漬0日間隔群では90.9%、1mg/l浸漬23日間隔群では83.3%であった。供試尾数に対する排精個体数の割合は、MT0.001mg/l浸漬0日間隔群で17.2%、0.001mg/l浸漬2日間隔群で10.3%、0.01mg/l浸漬2日間隔群で10.3%、0.01mg/l浸漬5日間隔群で13.8%であり、他の群ではいずれも10%以下であった。

24ヶ月令の時点で排精しなかった個体を解剖して調べた結果、高濃度または高頻度でMTを投与した群（1mg/l浸漬2、5日間隔、0.1mg/l浸漬0、2、5日間隔、0.01mg/l浸漬0日間隔）ではほとんどが生殖腺の形成不全または精巢の形態異常を示し、一方、低濃度または低頻度で投与した群（0.001mg/l浸漬5、11、23日間隔、0.01mg/l浸漬11、23日間隔、0.1mg/l浸漬23日間隔）ではほとんどが卵巣を持った雌個体であった。

考 察

本実験において約12ヶ月令の時点において排精個体の出現率が高かったのは0.01mg/l浸漬5日間隔群で33.3%であった。また、約24ヶ月令の時点において排精個体の出現率の高い群としては0.1mg/l11日間隔群、0.01mg/l5日間隔群、0.001mg/l2日間隔群でそれぞれ100%、0.001mg/l0日間隔群で90.9%、0.01mg/l2日間隔群で85.7%などであった。サクラマスにおける本実験の結果から、本実験飼育条件では、MT0.01mg/lの溶液に2日または5日間隔で浸漬するか、MT0.001mg/lの溶液に0日または2日間隔で浸漬した場合が機能的性転換雄の作出割合が高かった。したがって、MT0.01mg/lの溶液に5日間隔で浸漬投与するのが機能的性転換雄を作出する上で比較的効率的なMTの投与方法と考えられた。

本実験では、排精個体の出現率をMT投与の有効性の指標として用いている。性転換雄であっても、未成熟な場合や精巢形態の異常により、排精不能な個体が発見される場合がある。本実験において排精がみられない個体を開腹して生殖腺の状態を調べたところ、卵巣を持つ個体の他に生殖腺の形成不全、雌雄同体、及び精巢の形態異常を示す個体が認められた。生殖腺の形成不全及び精巢形態の異常は、MTの投与量が高すぎる場合にみられる現象であると考えられる。土屋（1984）は、ヤマメにMTを投与して作出したニセオスの精巢は著しく前方にのみ偏在し、輸精管が形成されず、通常の搾出法では精子を得られなかったと報告し、さらに高濃度のMTの投与により不妊化個体が発見されることを報告している。また、Okada *et al.*（1979）は、ニジマスの性転換雄作出において精巢の形態異常

を報告している。精巢の形態異常により精子を搾出できない個体は、開腹して精巢内精子を取り出して利用することも可能である(醒井養鱒場 1989)が、性転換雄の応用面からは、排精する個体の出現率を高めることが必要と考えられる。

桂, 戸田(1989)は, MTの浸漬濃度を0.001-0.1mg/lに変えてヤマメ稚魚に水温10.5℃でふ化後20日目から毎日2時間投与した場合, 14~15ヶ月令での成熟率と放精率は0.01mg/lで最も高く, 浸漬濃度がそれよりも高くなるほど, また, 低くなるほど低下することを報告している。また, 土屋(1984)は, ヤマメ稚魚をMT濃度0.01~1mg/lの溶液に1, 3, 5日間隔で浸漬し, 浮上後MT 1 mg/kgの飼料を8週間経口投与したところ, 約1年令における成熟雄の出現率が高かったのは, ふ化直後から0.01mg/l, 5日間隔群で22.9%, ふ化後10日目から0.1mg/l, 3日間隔群で20.0%であったと報告している。一方, 北海道立水産孵化場(1985)によれば, 池産サクラマスを材料として5~7日間隔, 浸漬濃度0.001~0.05mg/l, 浮上後MT 1 mg/kg dietの60日間経口投与において1⁺での成熟雄作出のための最適浸漬濃度を求めたところ, 0.05mg/lで最も雄化率が高く, 50%であった。また, 北海道立水産孵化場(1986)は, 5~7日間隔で浸漬濃度0.01mg/l, 浮上後1 mg/kg dietを60日間経口投与した群が0⁺の成熟雄の出現率が28.7%で最も高く, MTの浸漬濃度が上昇するに従い, 成熟雄の出現率は低くなったと報告している。以上のように, MTの浸漬濃度は0.01mg/l前後が最も適していると考えられる。今回の実験では, 0.01mg/lの浸漬濃度においては, 0日間隔では頻度が高すぎて生殖腺の形成不全を示す個体が出現し, 11日, 23日間隔では頻度が低すぎて性転換を示さない個体が多く出現した。しかし, 性転換雄の作出における最適濃度及び浸漬間隔についての研究は, 試験機関ごとの結果が異なるだけでなく, 同一の試験場において, ほぼ同様の供試魚を用いた場合にも必ずしも安定した結果は得られていない。この原因については明らかではないが, ヤマメ, 池産サクラマス, 天然遡上魚の供試魚の違いだけでなく, 水質や水温などにより, 投与されたホルモンの水中での吸収や分解が異なるためであろうと考えられる。

今回の実験においては, 浸漬間隔は, 浸漬濃度が低い場合は間隔を短く, 浸漬濃度が高い場合には長くとした方が機能的雄性化にはよいと考えられた。なお, 0.01mg/l以上の濃度で浸漬した場合には, 濃度の上昇及び間隔の短縮化に従って3ヶ月の時点での生残率が低下する傾向が認められ(Table 1), 理由は不明であるが高濃度のMT溶液に浸漬することにより稚魚の死亡の増加が認められた。しかし, 約12ヶ月, 24ヶ月の時点において個体数の減少が顕著な群はなく(Table 1, 2), MT処理終了後にはその影響が残っていないと考えられる。桂, 戸田(1989)は, ふ化20日目から浮上まで0.01mg/lと0.05mg/lの浸漬濃度について, 0, 1, 2, 3日間隔に投与間隔を変えて生残率を調べ, 浸漬間隔が長くなるほど生残率が低くなると報告している。本実験との違いの原因は明らかではないが, 彼らはMTを溶解したエタノール溶液を直接飼育水に添加していることから, MTの投与方法が異なることが原因のひとつであると推測される。また, 飼育水温が異なっていることから, 投与したMTの吸収や効果が異なってくる可能性も考えられる。飼育水の水温は, 投与したMTの吸収, 代謝及び排泄に影響を与えていると考えられるため, 最適な浸漬濃度や浸漬間隔は, 浸漬開始時期と共に水温に影響されるものと考えられる。MTの投与方法と水温との関係についてはより詳しく調べる必要があると思われる。

投与したMTが体内においてどのような作用機序により雄性化を引き起こすかについて

は未だ明らかになっていない。高橋（1978）は、性ステロイドによる機能的性転換を誘導するための要点を 1)適切な種類のホルモンを適切な量与えること, 2)適切な時期に与えること, 3)適切な方法で与えることであるとまとめているが、性転換を誘導するための性ステロイドの種類, 投与量, 投与方法についてさらに確実な情報を得るためには、作用機序の解明が必要と考えられる。

謝 辞

本研究の遂行に当たり様々な御協力, 御支援をいただいた富山県水産試験場の研究員, 職員の皆様に厚く御礼申し上げる。また, 本論文をまとめるに当たり, 御助言, 御校閲をいただいた当水産試験場新井茂場長に深謝の意を表す。

要 約

サクラマスの機能的性転換雄を効率的に作出するために, MTの投与方法を検討した。全雌サクラマス稚魚をふ化直後から浮上期までの35日間MT濃度を 0.001, 0.01, 0.1および 1 mg/l になるように調整した飼育水に 1日2時間, 0, 2, 5, 11および23日と間隔を変えて浸漬した。その後, 1 kg当り 1 mgのMTを含む配合飼料を60日間投与して無添加の配合飼料に切り替え 2年間飼育した。その結果, 0.01 mg/l 5日間隔で投与した群が, 約12ヶ月令の時点で33.3%, 約24ヶ月令の時点で100.0%の排精個体の割合を示し, この条件がサクラマスの性転換雄を作出するために最も適していると考えられた。

Table 1 Functional masculinization of genetic females in *Oncorhynchus masou* at 12 months induced by methyltestosterone

Dose of MT administered (mg/l water)	interval (days)	Initial No. of fish used (A)	survival No. of fish at 3 month	survival No. of fish at 12month(B)	functional male at 12month (C)	rate of functional male (%) C/B	C/A
0 (control)	0	58	26(44.8)	23(39.8)	0	0.0	0.0
	2	58	30(51.7)	22(37.9)	0	0.0	0.0
	5	58	11(19.0)	11(19.0)	0	0.0	0.0
	11	58	26(44.8)	23(39.7)	0	0.0	0.0
	23	58	27(46.6)	21(36.2)	0	0.0	0.0
0.001	0	58	24(41.1)	21(36.2)	3	14.3	5.2
	2	58	23(39.7)	18(31.0)	5	27.8	8.6
	5	58	31(53.4)	31(53.4)	0	0.0	0.0
	11	58	25(43.1)	24(41.1)	1	4.2	1.7
	23	58	24(41.1)	21(36.2)	0	0.0	0.0
0.01	0	58	10(17.2)	7(12.1)	0	0.0	0.0
	2	58	27(46.6)	21(36.2)	3	14.3	5.2
	5	58	23(39.7)	18(31.0)	6	33.3	10.3
	11	58	30(51.7)	24(41.1)	1	4.2	1.7
	23	58	29(50.0)	23(39.7)	0	0.0	0.0
0.1	0	58	9(15.5)	8(13.8)	0	0.0	0.0
	2	58	23(39.7)	13(22.4)	0	0.0	0.0
	5	58	19(32.8)	11(19.0)	1	9.1	1.7
	11	58	11(19.0)	8(13.8)	2	25.0	3.4
	23	58	26(44.8)	20(34.5)	0	0.0	0.0
1.0	0	58	0(0.0)	0(0.0)	0	0.0	0.0
	2	58	13(22.4)	10(17.2)	0	0.0	0.0
	5	58	17(29.3)	3*(5.2)	0	0.0	0.0
	11	58	11(19.0)	1*(1.7)	0	0.0	0.0
	23	58	26(44.8)	13(22.4)	4	30.8	6.9

Control group was sacrificed and checked gonadal differentiation at 6 month.

*: died by accident

Table 2 Functional masculinization of genetic females in *Oncorhynchus masou* at 24 months induced by methyltestosterone

Dose of MT administered (mg/ℓ water)	interval (days)	Initial	survival	functional	No. of fish having ovary	rate of functional male (%)	
		No. of fish used (A)	No. of fish at 24month(B)	male at 24month (C)		C/B	C/A
0.001	0	58	11(19.0)	10	0	90.9	17.2
	2	58	6(10.3)	6	0	100.0	10.3
	5	58	13(22.4)	5	6	38.5	8.6
	11	58	15(25.9)	1	13	6.7	1.7
	23	58	10(17.2)	0	10	0.0	0.0
0.01	0	58	2(3.4)	0	0	0.0	0.0
	2	58	7(12.1)	6	0	85.7	10.3
	5	58	8(13.8)	8	0	100.0	13.8
	11	58	7(12.1)	3	4	42.9	5.2
	23	58	15(25.9)	0	15	0.0	0.0
0.1	0	58	6(10.3)	0	1	0.0	0.0
	2	58	7(12.1)	2	0	28.6	3.4
	5	58	3(5.2)	2	0	66.7	3.4
	11	58	1(1.7)	1	0	100.0	1.7
	23	58	11(19.0)	0	11	0.0	0.0
1.0	0	58	0(0.0)	0	0	0.0	0.0
	2	58	8(13.8)	0	1	0.0	0.0
	5	58	1(1.7)	0	0	0.0	0.0
	11	58	0(0.0)	0	0	0.0	0.0
	23	58	6(10.3)	5	1	83.3	8.6

文 献

- 北海道立水産孵化場 1985. サケ科魚類の生物工学応用試験. 昭和60年度北海道立水産孵化場事業成績書. pp.197-199.
- 北海道立水産孵化場 1986. サケ科魚類の生物工学応用試験. 昭和61年度北海道立水産孵化場事業成績書. pp.207-211.
- 桂 和彦・戸田省三 1989. 昭和63年度地域バイオテクノロジー研究開発促進事業報告書 性コントロール技術の確立によるヤマメの全雌魚生産技術の開発 25pp. 山形県内水面水産試験場.
- 宮崎統五 1987. 昭和62年度地域バイオテクノロジー研究開発促進事業報告書 染色体操作によるサクラマスの不稔3倍体大量生産技術開発研究 16pp. 富山県水産試験場.
- 岡田鳳二 1989. 性の統御 pp.50-59, 水産増養殖と染色体操作 (鈴木 亮 編). 恒星社厚生閣, 東京.
- Okada, H., H. Matumoto, and F. Yamazaki 1979. Functional masculinization of genetic females in rainbow trout. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 45:413-419.
- 醒井養鱒場 1989. 昭和63年度地域バイオテクノロジー研究開発促進事業報告書 マス類の人為倍数体利用による育種に関する研究 41pp. 滋賀県醒井養鱒場.
- 鈴木裕之・桂 和彦 1988. 昭和62年度地域バイオテクノロジー研究開発促進事業報告書 性コントロール技術の確立によるヤマメの全雌魚生産技術の開発 24pp. 山形県内水面水産試験場.
- 高橋裕哉 1978. 性分化と性転換—魚類・両生類 pp.23-58, ホルモンの生物科学4 (日本比較内分泌学会編). 学会出版センター, 東京.
- 土屋文人 1986. ヤマメ性転換試験. 新潟県内水面水産試験場調査研究報告 13 :29-36.