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^{*1}

中 村 将・岩 橋 正 雄

(1981 年 10 月 14 日受理)

Studies on the Practical Masculinization in *Tilapia nilotica* by the Oral Administration of Androgen

Masaru NAKAMURA^{*2} and Masao IWAHASHI^{*3}

The purpose of the present investigation is to solve some practical problems concerning the complete masculinization in *Tilapia nilotica* by the oral administration of androgen with special regard to the size of fry at the start of treatment and to the dose of hormone. For this purpose, fry of each of three groups were daily fed on diets containing methyltestosterone (MT) at doses of 50 and 100 $\mu\text{g/g}$ diet for 30 days starting on the day of capture, 5th and 10th day of capture from the pond rearing the adult fish. The complete masculinization of genetic female could be brought about in the 2 groups in which MT at dose of 50 and 100 $\mu\text{g/g}$ diet was administered to fry (under 12.0 mm in total length) for 30 days from the day of the capture, though a few ovaries were discernible in both groups on the 16th day after the end of treatment. Remaining 4 groups treated with the same doses of hormone for 30 days from the 5th and 10th day of the capture resulted in the occurrence of intersexual gonads and ovaries. In most cases, these intersexual gonads were ovarian in nature in the anterior region, while they were apparently testicular in the posterior region.

近年、ティラピアは有望な養殖魚として我国においても各地で温泉水等の利用により養殖が盛んに行なわれるようになってきた。しかし、ティラピアは繁殖力が旺盛なため池中養殖においては十分に成長しないうちに産卵を繰り返し養殖池中に稚魚が大量に発生して親魚と摂餌競争を起し、大きさのそろった大型魚が得られにくいという障害が生じている。これらの問題を解決するため、雄性ホルモン処理によって雌の人為的性転換を起こさせ繁殖を抑制する方法が有望視されている。性ホルモン処理によるティラピア属の性転換に関してはいくつかの報告があるが、¹⁻¹⁰⁾ これがみな成功例であるとは限らず、成功例においても実用的レベルでの検討は必ずしも十分ではない。

そこで今回は、*T. nilotica* を用いて屋外水槽で大量の稚魚を雄性ホルモンのメチルテストステロン（以下 MT と略す）の経口投与による雄化処理を行い、処理開始時の体長、処理期間、ホルモン濃度等の問題についての検討を行った。あわせて捕獲後 339 日目の成長、および生

殖腺の発達についての検討も行なった。

材 料 と 方 法

Tilapia nilotica の稚魚は、夏期（7 月）に親魚池に遊泳中の体長の異なる稚魚を大量に捕獲し、これを 3 mm² の網目のもじ網でふるい、これを通して全長 8.5~12.0 mm の稚魚を実験に用いた。この大きさの約 1,000 尾の稚魚からなる 7 群をつくり、それぞれを 270×180×25 cm³ の屋外水槽に入れ、6 群をホルモン処理し、1 群を対照とした。ホルモン処理は、捕獲直後、捕獲後 5 日目、10 日目からと 3 つの時点で開始した。処理はどの時期とも MT-50 および 100 $\mu\text{g/g}$ 餌料の異なる 2 種の濃度で行なった。捕獲後 5 日目および 10 日目から処理を開始した群は、開始時までホルモンを含まない餌で飼育した。処理の継続期間は各群とも処理開始より 30 日間とし、餌は毎日朝、昼、夕の計 3 回、一度に体重の約 10% 見当の量を与えた。処理後はホルモンを含まない餌で飼育した。処理期間の水温は 27~30°C であった。

^{*1} 本報告の一部は昭和 55 年度日本水産学会春季大会で口頭発表した。

^{*2} 帝京大学医学部動物学教室 (Department of Zoology, Faculty of Medicine, Teikyo University, Otsuka, Hachioji, Tokyo 192-03, Japan).

^{*3} 新潟県内水面水産試験場 (Niigata Prefecture Freshwater Fisheries Experimental Station, Nagaoka 940-11, Japan).

秋期に水温が低下したため、各群の魚は室内水槽に移した。その際飼育の都合上、各群を約 200 尾まで減らした。水温 15~20°C で越冬させた後、水温の上昇をみはからって再び屋外水槽に移して飼育した。

性ホルモンを含む餌の作製のため、MT の結晶をあらかじめ一定の濃度で溶解し、これを養鯉稚魚用ベレット 1 g につき 50 μ g と 100 μ g の濃度になるように均一に加えた後、アルコールを蒸発させ乾燥させた。一方、対照群の餌はアルコールのみを加え乾燥させた。

処理終了後短期間（捕獲後 46 日目）で各群から約 10 個体をサンプリングし、生殖腺の組織学的観察を行なった。さらに処理後長期間（捕獲後 339 日目）に各群の全ての魚を麻酔し、体重の測定後、開腹し肉眼的に生殖腺の発達の観察と雌雄の判別を行なった。その際、未発達で肉眼的に雌雄の判定不可能な生殖腺や異常と思われる生殖腺は組織標本を作り顕微鏡観察を行なった。

組織学的観察のため生殖腺はブアン固定され、通常のパラフィン法により厚さ 8 μ の横断、縦断切片を作製し、デラフィールドのヘマトキシリン、エオシン染色を施し観察に供した。

結 果

捕獲直後（全長、8.5~12.0 mm、平均 10.5 mm）よ

り MT-50 μ g、MT-100 μ g で 30 日間処理した結果を Table 1 に示した。処理後短期間（捕獲後 46 日目）での組織学的観察では、MT-50 μ g 処理群でわずか 1 個体が、MT-100 μ g 処理群では 2 個体が卵巢を持っているのが観察された。しかし、卵巢中の卵は対照群の卵巢（Fig. 1）と比べると数は著しく少なく、発達の遅れているものであった（Fig. 2）。更に生殖腺の基部には、輸精管原基の分化がみられ部分的に雄化していることが確かめられた。また、MT-50 μ g 処理群の 8 個体の精巣には、卵巢腔を有するものが出現した（Fig. 3）。

処理後長期（捕獲後 339 日目）では、肉眼的および組織学的観察から MT-50 μ g 処理群の 47 個体と MT-100 μ g 処理群の 43 個体全て完全な精巣を持つ雄であった（Fig. 4）。両群の精巣は発達の遅れて細いひも状のものから、精子が充分につまって完熟し太くなっているものまでさまざまな発達段階にあった（Table 5）。雌雄同体や卵巢を持つ個体は全く認められなかったことから雄化が完全であったことが確かめられた。

捕獲後 5 日目（全長、11.2~14.6 mm、平均 12.7 mm）より MT-50 μ g と MT-100 μ g で 30 日間処理した結果を Table 2 に示した。処理後短期間で MT-50 μ g 処理群で 3 個体、MT-100 μ g 処理群で 2 個体卵巢を持つ個体が出現した。この卵巢は対照のそれと比較すると発達

Table 1. Effect of oral administration of methyltestosterone (50 and 100 μ g/g diet) during the 30 days period from the day of the capture upon the sex differentiation in *Tilapia nilotica*. ♂₁, ♂₂, ♀, ♀₂ and ♀₁ respectively indicate males with normal testes, males with testes modified by the occurrence of ovarian cavity, intersexes with ovarian and testicular tissues, females with ovaries modified by the occurrence of efferent duct, and females with normal ovaries

Dose of methyltestosterone (μ g/g diet)	Age after the capture (Days)	Sex distribution					Total
		♂ ₁	♂ ₂	♀	♀ ₂	♀ ₁	
50	46	4	8	0	1	0	13
	339	47	0	0	0	0	47
100	46	8	0	0	1	1	10
	339	43	0	0	0	0	43
0 (Control)	46	6	0	0	0	4	10
	339	36	0	0	0	14	50

Table 2. Effect of oral administration of methyltestosterone (50 and 100 μ g/g diet) during the 30 days period from the 5th day of the capture upon the sex differentiation in *Tilapia nilotica*. The meaning of symbols ♂₁, ♂₂, ♀, ♀₂ and ♀₁ is the same as shown in Table 1

Dose of methyltestosterone (μ g/g diet)	Age after the capture (days)	Sex distribution					Total
		♂ ₁	♂ ₂	♀	♀ ₂	♀ ₁	
50	46	10	0	0	3	0	13
	339	49	0	1	0	0	50
100	46	5	3	0	2	0	10
	339	46	0	3	0	1	50
0 (Control)	46	6	0	0	0	4	10
	339	36	0	0	0	14	50

Table 3. Effect of oral administration of methyltestosterone (50 and 100 $\mu\text{g/g}$ diet) during the 30 days period from the 10th day of the capture upon the sex differentiation in *Tilapia nilotica*. The meaning of symbols σ_1 , σ_2 , φ , φ_2 and φ_1 is the same as shown in Table 1

Dose of methyltestosterone ($\mu\text{g/g}$ diet)	Age after the capture (days)	Sex distribution					Total
		σ_1	σ_2	φ	φ_2	φ_1	
50	46	6	0	0	1	2	9
	339	33	0	6	0	8	47
100	46	2	0	0	5	3	10
	339	5	0	0	0	0	5*
0 (Control)	46	6	0	0	0	4	10
	339	36	0	0	0	14	50

* Most of fish escaped accidentally from the rearing net during the winter.

Table 4. Mean body weight, standard deviation (SD) and coefficient of variation (CV) in each group on the 339th day after the capture

Dose of methyltestosterone ($\mu\text{g/g}$ diet)	Age at start of treatment (days after the capture)	No. of fish examined	Sex distribution	Body weight (g) (mean $\pm$ SD)	CV of body weight (%)
0 (Control)	0	50	σ 36	105.2 $\pm$ 18.4	17.5
			φ 0	—	—
			φ 14	105.4 $\pm$ 17.1	16.2
50	0	47	σ 47	118.0 $\pm$ 20.3	17.2
			φ 0	—	—
			φ 0	—	—
100	0	43	σ 43	135.9 $\pm$ 25.9	19.0
			φ 0	—	—
			φ 0	—	—
50	5	50	σ 49	135.6 $\pm$ 27.1	20.0
			φ 1	137.0	—
			φ 0	—	—
100	5	50	σ 46	121.9 $\pm$ 21.8	17.9
			φ 3	137.0 $\pm$ 1.7	1.3
			φ 1	100.0	—
50	10	47	σ 33	104.9 $\pm$ 22.1	21.1
			φ 6	99.0 $\pm$ 17.5	17.7
			φ 8	93.4 $\pm$ 22.2	23.8
100	10	5	σ 5	95.2 $\pm$ 53.2	62.5
			φ 0	—	—
			φ 0	—	—

が遅れており、卵も少なく、輸精管の分化もみられ一部雄化しているのが認められた。また、MT-100 μg 処理群の3個体の精巣に卵巣腔が形成されているのが認められた。

処理後長期間では、MT-50 μg 処理群の50個体中わずか1個体が、また、MT-100 μg 処理群の50個体中3個体が生殖腺の前方が卵巣で後方が精巣である雌雄同体であった (Fig. 5)。この生殖腺の組織学的観察では、卵巣部分は卵黄を蓄積した卵や若い卵を多数有し、卵巣腔も正常に発達していた (Fig. 6)。一方、精巣部分

は活発な精子形成が進行しており、輸精管の発達もみられた (Fig. 7)。MT-100 μg 処理群中にわずか1個体正常に発達した卵巣が出現した。しかしながら、両処理群の残りの多くは種々の発達段階にある精巣であった (Table 5)。

捕獲後10日目 (全長, 13.2~20.2 mm, 平均15.9 mm) より MT-50 μg および MT-100 μg で30日間処理した結果を Table 3 に示した。処理後短期間の MT-50 μg 処理群で9個体中3個体、MT-100 μg 処理群で10個体中8個体が卵巣を持つ個体であった。やはり卵巣の発達

Table 5. Gonadal maturity of control and experimental groups on the 339th day after the capture. ++, + and - respectively indicate full matured gonads, developing gonads and immature gonads. Figures in parentheses indicate the number of fish

Dose of methyl-testosterone ($\mu\text{g/g}$ diet)	Age at start of treatment (days after the capture)	No. of fish examined	Sex distribution	Frequency of gradation (%)		
				++	+	-
0 (Control)	0	50	♂ 36	22.2 (8)	22.2 (8)	55.6 (20)
			♀ 0	—	—	—
			♀ 14	50.0 (7)	35.7 (5)	14.3 (2)
50	0	47	♂ 47	4.3 (2)	10.6 (5)	85.1 (40)
			♀ 0	—	—	—
			♀ 0	—	—	—
100	0	43	♂ 43	0	16.3 (7)	83.7 (36)
			♀ 0	—	—	—
			♀ 0	—	—	—
50	5	50	♂ 49	8.2 (4)	24.4 (12)	68.3 (33)
			♀ 1	0	0	100.0 (1)
			♀ 0	—	—	—
100	5	50	♂ 46	6.5 (3)	19.6 (9)	73.9 (34)
			♀ 3	0	0	100.0 (3)
			♀ 1	0	0	100.0 (1)
50	10	47	♂ 33	9.1 (3)	15.2 (5)	75.7 (25)
			♀ 6	0	0	100.0 (6)
			♀ 8	25.0 (2)	0	75.0 (6)
100	10	5	♂ 5	0	20.0 (1)	80.0 (4)
			♀ 0	—	—	—
			♀ 0	—	—	—

が抑制されており、また、組織中には輸精管原基が分化する卵巣もみられた。

処理後長期間では、MT-50 μg 処理群で卵巣を持つ個体が 47 個体中 8 個体、雌雄同体が 6 個体と明らかに前

述の実験結果と比べると雌と雌雄同体の出現する割合が増加した。なお、MT-100 μg 処理群は越年中大部分の魚が網が破れ散逸してしまい正確な性比を調べることは出来なかった。

Explanation of Figures

Fig. 1. Cross section of a control ovary at the 46th day after the capture. Oc, ovarian cavity. $\times 370$.

Fig. 2. Cross section of an ovary (type ♀₂) of fish treated with methyltestosterone (MT) (50 $\mu\text{g/g}$ diet) from the day of the capture for 30 days and examined at the 46th day after the capture, revealing the appearance of efferent duct (Ed) in the ovarian tissue. Oc, ovarian cavity. $\times 370$.

Fig. 3. Cross section of a testis (type ♂₂) of fish treated with MT (50 $\mu\text{g/g}$ diet) from the day of the capture for 30 days and examined at the 46th day after the capture, revealing the formation of ovarian cavity (Oc) in the affected testis. Ed, efferent duct. $\times 370$.

Fig. 4. Cross section of a testis of fish treated with MT (50 $\mu\text{g/g}$ diet) from the day of the capture for 30 days and examined at the 339th day after the capture, revealing nearly normal testicular development. $\times 370$.

Figs. 5-7. Transverse sections through an intersexual gonad (type ♀) of fish treated with MT (100 $\mu\text{g/g}$ diet) from the 5th day after the capture for 30 days and examined at the 339th day after the capture. Fig. 5 shows the ovarian tissue (Ov) in the anterior region and the testicular one (Te) in the posterior region. Fig. 6 reveals the oogenesis in the anterior region. Fig. 7 shows an active spermatogenesis in the posterior region. Ed, efferent duct; Oc, ovarian cavity. Fig. 5 $\times 70$; Fig. 6 $\times 180$; Fig. 7 $\times 370$.

Fig. 8. Histograms of body weight (g) of male fish in the control and experimental groups at the 339th day after the capture. 1, group treated with MT 50 $\mu\text{g/g}$ diet from the day of the capture for 30 days; 2, group treated with MT 100 $\mu\text{g/g}$ diet from the day of the capture for 30 days; 3, group treated with MT 50 $\mu\text{g/g}$ diet from the 5th day of the capture for 30 days; 4, group treated with MT 100 $\mu\text{g/g}$ diet from the 5th day of the capture for 30 days; 5, group treated with MT 50 $\mu\text{g/g}$ diet from the 10th day of the capture for 30 days.

実験終了時（捕獲後 339 日目）に測定した雄個体の体重の分布を Fig. 8 に、雌雄および雌雄同体個体の平均体重と体重の変動の程度を Table 4 に示した。捕獲直後から MT-100 μg で処理した群と捕獲後 5 日目から MT-50 μg で処理した群の雄の平均体重は、対照群の雌雄の平均体重と比べると著しく大きかった。また、捕獲直後より MT-50 μg で処理した群と 5 日目から MT-100 μg で処理した群も対照群よりやや大きな値を示した。体重の変動係数には対照群と処理群の間で大きな差はみられなかった。このように MT 処理により雄化が得られた群においては対照群より体重が増加するという結果が得られた。しかし、今回の実験においては対照群の雌雄間には体重の差は認められなかった。

次に、実験終了時における生殖腺の成熟について肉眼的に判定した。完全に成熟し精子や卵がつまって太くなっている状態の生殖腺を $\oplus$ 、成熟途上でわずかに太くなっている状態の生殖腺を $\circ$ 、全く未熟で細いままの状態の生殖腺を $-$ とした。その結果を Table 5 に示した。対照群の雌は、成熟したり成熟途上の個体が 85% で雄では 45% にあるのに対して、各処理群の雄では 15~32%

と低い値を示し、発達が遅れる傾向が肉眼的に観察された。

考 察

性ホルモン処理により性転換を行なううえで最も重要なことは処理開始時における稚魚の大きさと処理期間を知ることである。本実験では、完全な性転換を起こした 2 群（捕獲直後、MT-50 および 100 μg 処理）の処理開始時における全長は、8.5~12.0 mm であった。また、処理の継続期間は 30 日であった。JALABERT ら⁴⁾は、*T. nilotica* を用いて MT-40 $\mu\text{g/g}$ 餌料で親の口から出たばかりの稚魚を 2 ヶ月間継続して処理することにより雄化が得られたことを報告している。また、TAYAMEN ら⁷⁾も、全長 9~12 mm の稚魚を 25, 35, 59 日間、MT-30~60 $\mu\text{g/g}$ 餌料で処理することにより 100% 近く雄化したことを報告した。このことから、*T. nilotica* の場合、100% の雄化を得るには少なくとも 12.0 mm 以下の稚魚を用いて約 30 日間の処理を継続する必要があることが示唆された。

一般に性ホルモン処理により機能的かつ完全な性転換を得るには、処理を生殖腺の未分化な時期から分化が明らかになる時期まで継続する必要があるとされている。NAKAMURA ら³⁾は、*T. mossambica* を用いて形態的に性分化が明らかになる以前に“生理的”性分化期があり、完全な性転換を得るには、“生理的”性分化期を含めた処理が必要であることを強調した。このことから逆に、*T. nilotica* の“生理的”性分化期と形態的性分化の起こる時期は、全長 12.0 mm 以上にあると推定される。

一方、処理のホルモン濃度については、前述のように JALABERT⁴⁾ および TAYAMEN ら⁷⁾がそれぞれ MT-40 μg および MT-30~60 $\mu\text{g/g}$ 餌料で有効であることを報告している。本実験においては MT-50 および MT-100 $\mu\text{g/g}$ 餌料どちらも雄化に有効であったことが確かめられた。このことから雄化に有効な MT の濃度は 30~100 $\mu\text{g/g}$ 餌料の範囲にあると推定される。しかし、この濃度の餌料を与えても、処理池における大量の動植物プランクトンの発生等によって、性ホルモンを含む餌の摂餌量が低下した場合には完全な性転換は得られないであろう。また、より高濃度の雄性ホルモンの使用は、遺伝的雄の逆説的雌化を起こすことが知られている⁸⁾ので、処理魚の摂餌状況を考慮しながら適量内での処理を行なうことが必要である。

処理後短期間の各群の生殖腺の組織学的観察で、輸精管原基が形成されて部分的に雄化したり、発達が抑制された卵巣が出現した。捕獲後 339 日目の観察では、捕獲直後より処理を開始した 2 群では全く卵巣は認められなかったが、処理の開始を遅らすにつれて間性や卵巣の出

現する割合が増加した。河本^{12,13)}は、メダカの MT 処理による遺伝的雄の雄への性転換過程において一時的に卵母細胞が分化し、その後退化して精巢へと分化する過程を観察している。NAKAMURA⁹⁾も *T. mossambica* の MT 処理による雄化においてもやはり同様な過程を観察した。このことから考えると、捕獲直後より開始した両群の処理終了後短期間で出現した卵巣は、その後の長期の飼育の間に精巢へと完全に転換したものと考えられる。しかしながら、捕獲後 5 日目、10 日目より処理を開始した群に処理後短期間で出現した卵巣は、その後全て雄化に至らず、一部は間性化したり、そのまま卵巣に分化したものと考えられる。

興味あることに、処理魚に出現した間性の生殖腺は、前方部分が卵巣組織で、後方部分は精巢組織を持つ構造であった。YAMAMOTO¹⁴⁾は、メダカで雌性ホルモン処理により前方部分が精巢で後方部分が卵巣の間性の生殖腺を報告している。この事実は、生殖腺の分化の開始が、前方部分と後方部分で時間的に異なることを示唆している。つまり、処理の開始時には、前方部分では遺伝的性の分化がすでに開し、処理後も正常に分化したのに対して、後方部分のまだ分化していない部分は、外因性の性ホルモンにより遺伝的性とは反対の性へと分化したものと考えられる。この結果として前方部分と後方部分が異なる雌雄同体が出現したと結論される。

今回の実験結果では、ホルモン処理により雄化が得られた群の捕獲後 339 日目の雄の体重は明らかに対照群や性転換の起こらなかった群の雄の体重よりも大きく、成長が良い結果が得られた。精巢の成熟の程度に関しては、成長とは逆に、雄化が得られた群で成熟した個体の占める比率が対照群よりも明らかに小さく、成熟が遅れる傾向が認められた。しかしながら処理終了個体の完全

な成熟に至るまでの飼育とその間の成長に関する研究は今後の課題として残された。

終りに、本論文をまとめるにあたり、懇篤な御助言をたまわった帝京大学山岸宏教授に深く感謝の意を表します。

文 献

- 1) B. ECKSTEIN and M. SPIRA: *Biol. Bull.*, **129**, 482-489 (1965).
- 2) H. P. CLEMENS and T. INSLEE: *Trans. Amer. Fish. Soc.*, **97**, 19-21 (1968).
- 3) M. NAKAMURA and H. TAKAHASHI: *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*, **24**, 1-13 (1973).
- 4) B. JALABERT, J. MOREAU, P. PLANQUETTE, and R. BILLARD: *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **14**, 729-739 (1974).
- 5) M. NAKAMURA: *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*, **26**, 99-108 (1975).
- 6) R. D. GUERRERO, III: *Trans. Amer. Fish. Soc.*, **104**, 342-348 (1975).
- 7) M. M. TAYAMEN and W. L. SHELTON: *Aquaculture*, **14**, 349-354 (1978).
- 8) H. YOSHIKAWA and M. OGURI: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **44**, 1093-1097 (1978).
- 9) G. L. JENSEN and W. L. SHELTON: *Aquaculture*, **19**, 233-242 (1979).
- 10) K. D. HOPKINS, W. L. SHELTON, and C. R. ENGLE: *Aquaculture*, **18**, 263-268 (1979).
- 11) T. YAMAMOTO: in "Fish Physiology" (ed. by W. S. HOAR and D. J. RANDALL), Vol. 3, Academic Press, New York, 1969, pp. 117-175.
- 12) 河本典子: 発生生物学誌, **24**, 48-49 (1970).
- 13) 河本典子: 動維, **82**, 29-35 (1973).
- 14) T. YAMAMOTO: *J. Exp. Zool.*, **137**, 227-264 (1958).