

エストロンの経口投与がドジョウ *Misgurnus anguillicaudatus* の 性転換に及ぼす影響^{*1}

久保田善二郎・中嶋 勇^{*2}・渡辺直樹^{*3}

Influence of Oral Treatment of Estrone
on the Sex Reversal of the
Loach *Misgurnus anguillicaudatus*

Zenjiro Kubota, Isamu Nakajima, and Naoki Watanabe

The authors studied the influence of oral treatment of estrone on sex reversal of the loach *Misgurnus anguillicaudatus*. The fish were raised on the dietary estrone levels of 25, 50, 100, 150, and 200 mg/kg for 40 days from the initial age of 14th day after hatching, and raised afterwards without estrone for 11 months. All the loach raised on the dietary estrone levels of 100 and 150 mg/kg resulted in females. The main secondary sexual characters of the loach showed the female characters in less dietary estrone level than in the one demanded for sex reversal. Percentage of the malformed fish indicated no great difference in both the oral-treated and the control groups. Mean body length and mean body weight in the sex-reversed females were the same as those in the genetic females, and larger than those in the genetic males. Percentage of ovary weight to body weight, weight-multiplicating rate, and survival rate in each group decreased with the advance of the dietary estrone levels. At present it seems ineffective to apply the oral treatment of estrone to the loach culture.

1. まえがき

ホルモン処理による魚類の性転換法には、稚魚を雄性化または雌性化する直接法と、その処理によって遺伝的性が機能的に逆転した性転換魚と正常魚とを交配し、性染色体の組み合わせによってF₁またはF₂世代での性比をコント

ロールする間接法^{1~12)}がある。そして、直接法はホルモンを稚魚に経口投与する方法と、ホルモン溶液の中で稚魚を飼育する方法の2つに分けられる¹²⁾。

筆者ら^{13, 14)}は、すでに、この直接法のうちの後者の方法によりエストロン（以下Esで示す）を用いてドジョウの性転換を行うことができた。この方法により性転換した

*1 水産大学校研究業績 第1155号, 1988年1月13日受理.

Contribution from Shimonoseki University of Fisheries, No. 1155. Received Jan., 13, 1988.

*2 日魯漁業株式会社

*3 茨城県農林水産部漁政課

雌は、遺伝的雌と同様に雄よりも優れた成長を示し、その上、生存率も高かったので、ドジョウの正産量を増加させることに有効であると結論された。

本実験は、直接法の前者の方法、つまりドジョウ稚魚にEsを経口的に与えた場合、その投与量が性転換率、成長度、減耗率および増重倍率に及ぼす影響を調査し、この方法がドジョウ養殖を行う場合に効果があるかどうかを知る目的で行った。

2. 材料および方法

飼育実験は、1984年6月9日から1985年7月8日までの間、室内に設置したガラス水槽および屋外の実験池をそれぞれ7個用いて実施した。

ガラス水槽は、底部に厚さが約3 cmになるように直径が0.2~7.0 mm、平均0.6~1.0 mmの砂を敷きつめた底面濾過式のもので、その大きさは60×29×高さ36 cmであった。水深は約20 cmに保ち、1分間における循環水量は2.8~3.1 lであった。

実験池は、大きさが200×100×高さ80 cm、コンクリート製で、池底に泥を厚さが1~3 cmになるように敷き、エアレーションを行うと共に、半流水式とした。1分間の注水量は0.5 l (1日の換水率0.7~0.9回)、同じく送気量は約3 lとし、水深を40~50 cmに保った。

供試魚は、1984年6月6日に体重がいずれも39 gの雌親魚2尾にゴナトロピン (帝國臓器株式会社製) 1000単位を注射後、9~12 gの雄5尾と共に75×45×高さ45 cmの同一ガラス水槽に収容して自然産卵させ、1984年6月9日にふ化したものである。

ふ化後2日目に仔魚を50尾ずつ循環濾過式水槽7個に放養した。つづいてふ化後14日目から40日間、対照の2群を除いた5群に、餌料1 kg当たり25, 50, 100, 150, 200 mgの割合でEsを添加したのを与え、その後では無添加餌料で飼育した。そして1984年8月6日に各群のドジョウをとりあげて、それぞれの実験池に移し、さらに11か月間飼育した。

餌料は日本配合飼料株式会社製の養鰻用粉餌No.2Mであった。給餌は、ガラス水槽における飼育期間中では1水槽1日当たり0.2~0.5 gの餌料を煮沸して散布する方法で、また、実験池における飼育期間中では1日当たり魚体重の3~10%量の餌料を、そのまま練り固めて磁製皿に入れ、それを池底に沈める方法で、それぞれ行なった。なお、1984年10月12日~1985年4月15日の間では、低温のため給

餌を中止した。

飼育実験終了後に体長、全長および背、胸、腹、臀の各鰭長ならびに体重、生殖腺重量を測定した。さらに、すべての個体の胸鰭を切断してHollisterの方法で透明標本とし、骨質薄板の存在を確かめると共に、その長さをマイクロメーターで測定した。

性の決定は生殖腺を鏡検して行った。それによっても、なお性の判定が困難な場合には、パラフィン法によって厚さ10 μmの切片とし、DelafieldのHematoxyline-Eosinで染色して顕微鏡下で調べた。

なお、給餌期間中の水温は、ガラス水槽では23.5~30.3℃、実験池では1984年8月11日~10月1日の間で19.3~33.2℃、1985年4月16日~7月6日の間は17.2~26.8℃であった。

3. 結果

3.1 性比

餌料1 kgに対するEsの添加量と性比との関係をTable 1に示した。雌の出現率は、対照群の66.7%と74.3%に対してEs添加量が50 mgまでの群では64.7~77.3%で、ほとんど変化がなかった。しかし、それ以上の添加量では急増し、100, 150 mgでは100%になった。そして200 mgでは、間性が16.7%出現したので、83.3%に低下した。

3.2 第二次性徴

Esの添加量が主な性徴形質にどのように影響するかを知るために、群別、雌雄別による全長および背鰭、胸鰭、腹鰭、臀鰭の各長さ、ならびに胸鰭の骨質薄板長の体長に対する割合の平均値を求めた。そして、これらの値とEs添加量との関係をFig. 1に示した。雄においては、臀鰭長、骨質薄板長ではEs添加量が25 mg、背鰭、胸鰭、腹鰭長では50 mgから、それぞれ減少した。これらのうち、胸鰭、腹鰭、臀鰭長の体長に対する割合は、50 mg群と対照群との間において $P < 0.05$ の範囲で有意差が認められた。前述のように、性はEsの添加量が100 mgで転換したから、これらの結果は性徴形質が性転換に必要な添加量よりも少ない量で、すでに雌性化されることを示している。

一方、雌における各形質は、いずれもEs添加量に大きく影響されなかった。

Table 1. Sex ratio of the loach raised on each dietary estrone level for 40 days from the initial age of 14th day after hatching, and raised afterwards without eatrone for 11 months

Dietary estrone level (mg/kg)	Number of individuals				$\frac{\text{♀}}{\text{T}}$ (%)	$\frac{\text{♂}}{\text{T}}$ (%)	$\frac{\text{♂♀}}{\text{T}}$ (%)
	♀	♂	♂♀	Total (T)			
0 (Control 1)	26	9	0	35	74.3	25.7	0
0 (Control 2)	24	12	0	36	66.7	33.3	0
25	17	5	0	22	77.3	22.7	0
50	11	6	0	17	64.7	35.3	0
100	24	0	0	24	100.0	0	0
150	9	0	0	9	100.0	0	0
200	5	0	1	6	83.3	0	16.7

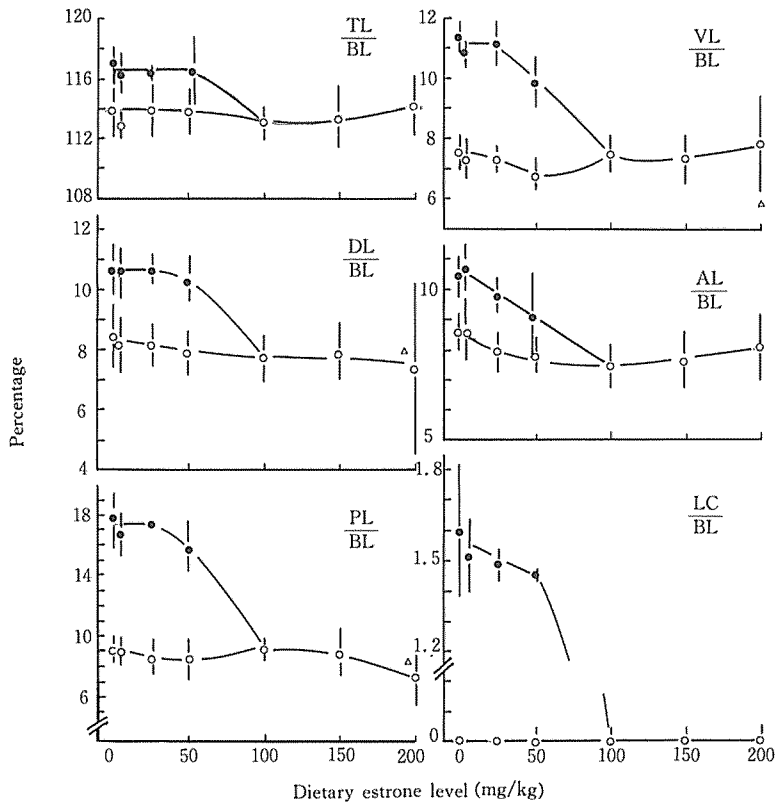


Fig. 1. Relationship between dietary estrone level and six distinct sexual characters of the loach. Bars indicate the standard variation. ○, female; ●, male; △, intersex. BL, body length; TL, total length; DL, dorsal fin length; VL, pelvic fin length; PL, pectoral fin length; AL, anal fin length; LC, lamina circularis length of pectoral fin.

3.3 奇形

Es 添加量と奇形魚の出現率との関係を Table 2 に示した。奇形魚の出現率は、対照群では 2.9% と 16.7% に対して、Es 添加量が 25~150 mg の範囲では 0~27.3% で、両者間に大きい差異は認められなかった。しかし 200 mg では 50% で、対照群よりも著しく大きい値を示した。

奇形の型は、前報¹⁴⁾で述べたように次の 4 型に大別された。すなわち I 型は鰭条の屈折、湾曲、萎縮、融合、II 型は脊椎骨の上下方向または水平方向への湾曲、屈折、III 型は吻部の鈍円、短縮、IV 型は体の短縮、胸部の肥大などであった。なお、奇形魚の中には I 型と II 型、または I 型と

III 型のような複数の型をもった個体が認められた。Es 添加量と各奇形型の出現数および出現率との関係を Table 3 に示した。なお、この表の奇形魚数は、I 型と III 型のような複数の型をもった個体では、両型に個体数を加算して示した。出現率は 25, 50, 100 mg 群では I 型、200 mg 群と対照群では III 型が最も高かった。

3.4 成熟度

各群における生殖腺重量の体重に対する割合、つまり成熟度指数の平均値を Table 4 に示した。Es 添加量 X (mg) と卵巣重量の体重に対する割合 Y (%) との関係は

$$Y = -0.024X + 22.085 \quad (r = -0.88)$$

Table 2. Percentage of the malformed loach raised on each dietary estrone level for 40 days from the initial age of 14th day after hatching, and raised afterwards without estrone for 11 months

Dietary estrone level (mg/kg)	Number of individuals		Percentage of malformed fish
	Total	Malformed fish	
0 (Control 1)	35	1	2.9
0 (Control 2)	36	6	16.7
25	22	6	27.3
50	17	1	5.9
100	24	5	20.8
150	9	0	0
200	6	3	50.0

Table 3. Dietary estrone level and number of the malformed loach in each type of malformation. A fish having two types of malformation is treated as two specimens. Type I, malformation in fins; II, flexion of spinal column; III, malformation of snout; IV, shrinkage of body

Dietary estrone level (mg/kg)	Number of malformed fish				Percentage of malformed fish			
	Type				Type			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV
0 (Control 1)	1	0	1	0	50.0	0	50.0	0
0 (Control 2)	0	0	6	0	0	0	100.0	0
25	4	1	2	0	57.1	14.3	28.6	0
50	1	0	0	0	100.0	0	0	0
100	5	1	1	0	71.4	14.3	14.3	0
150	—	—	—	—	—	—	—	—
200	1	1	2	1	20.0	20.0	40.0	20.0

Table 4. Mean value of percentage of gonad weight to body weight of the loach raised on each dietary estrone level for 40 days from the initial age of 14th day after hatching, and raised afterwards without estrone for 11 months

Dietary estrone level (mg/kg)	Sex	Percent of gonad weight to body weight (M ± S. D.)
0 (Control 1)	♀	23.9 ± 5.5
	♂	0.73 ± 0.21
0 (Control 2)	♀	21.3 ± 6.3
	♂	1.02 ± 0.28
25	♀	21.0 ± 6.3
	♂	0.96 ± 0.27
50	♀	19.6 ± 4.9 *1
	♂	0.58 ± 0.15 *2
100	♀	20.3 ± 6.6 *1
	♂	
150	♀	18.6 ± 4.1 *1
	♂	
200	♀	17.3 ± 3.8 *1
	♂	
	♂	
	♀	0.10 ± 0

* Values with *1 and *2 are statistically different from those of the control (1) and (2) respectively, P<0.05.

の式で表わされる。このように雌における成熟度指数は Es 添加量の増加に伴って減少した。

3.5 成長度

Es 添加量と実験終了時における各群の平均体長および平均体重との関係を Table 5 に示した。平均体長は、雌の対照群では 105 mm と 103 mm に対して実験群では 150 mg 群の 124 mm を除くと 102~110 mm, また、雄の対照群では両群とも 95 mm に対して実験群では 87 mm と 96 mm で、Es 添加量の増加に伴う変化は雌雄ともになかった。一方、平均体重は、雌の対照群では 14.6g と 15.5g に対して実験群では 150 mg 群の 23 g を除くと 13.8~16.2 g, また、雄の対照群では 8.0 g と 8.1 g に対して実験群では 7.1 g と 7.2 g で、平均体長の場合と同様に、Es 添加量の多少に影響されなかった。そして間性では 23.0 g で、雄よりも雌に近い値を示した。このように性転換した雌の平均体長および平均体重は、遺伝的雌とほぼ同じであり、遺伝的雄よりも大きかった。この結果は前報告^{13, 14)}と一致する。

Es 添加量 X (mg) と実験期間中における各群の増重倍率 Y との関係を図 2 に示した。両者の関係は

$$Y = -47.05X + 13426 \quad (r = -0.80)$$

の式で表わされ、増重倍率は Es 添加量の増加に伴って減少した。

3.6 生存率

Es 添加量 X (mg) と循環濾過式水槽および実験池における飼育期間中の各群の生存率 Y (%) との関係を図 3 に示した。両者の関係は

循環濾過式水槽では

$$Y = -0.21X + 79.65 \quad (r = -0.85)$$

実験池では

$$Y = -0.24X + 80.00 \quad (r = -0.92)$$

の式でそれぞれ表わされる。このように水槽および実験池における生存率は、いずれも Es 添加量の増加に伴って減少した。

飼育実験が終了してから、供試魚を解剖した結果、実験群における肝臓および脾臓は、対照群のものよりも、わず

Table 5. Mean value of body length and body weight of the loach raised on each dietary estrone level for 40 days from the initial age of 14th day after hatching, and raised afterwards without estrone for 11 months

Dietary estrone level (mg/kg)	Sex	Body length (mm) (M ± S. D.)	Body weight (g) (M ± S. D.)
0 (Control 1)	♀	105.1 ± 12.9	15.5 ± 4.5
	♂	95.0 ± 4.8	8.1 ± 1.2
0 (Control 2)	♀	103.2 ± 25.8	14.6 ± 8.0
	♂	95.0 ± 3.6	8.0 ± 0.9
25	♀	103.1 ± 25.2	15.2 ± 8.6
	♂	87.3 ± 21.3	7.1 ± 3.9
50	♀	109.5 ± 11.3	13.8 ± 4.6
	♂	95.6 ± 4.9	7.2 ± 1.4
100	♀	104.7 ± 17.9	14.8 ± 6.2
	♂	—	—
150	♀	123.6 ± 27.5	23.1 ± 12.2 *2
	♂	—	—
200	♀	102.2 ± 39.9	16.2 ± 13.0
	♂	—	—
	♀	135.5 ± 0	23.0 ± 0

* Values with *2 is statistically different from that of the control (2), $P < 0.05$.

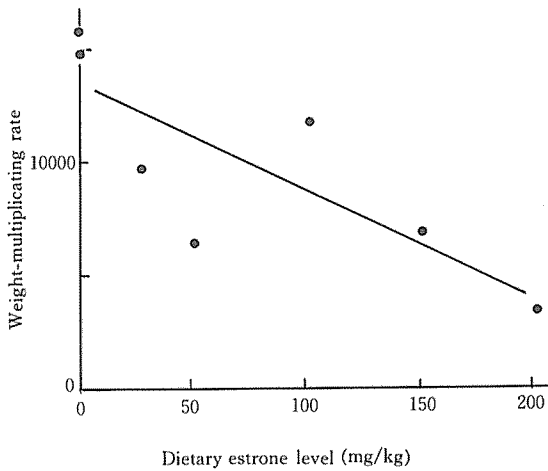


Fig. 2. Relationship between dietary estrone level and weight-multiplying rate of the loach.

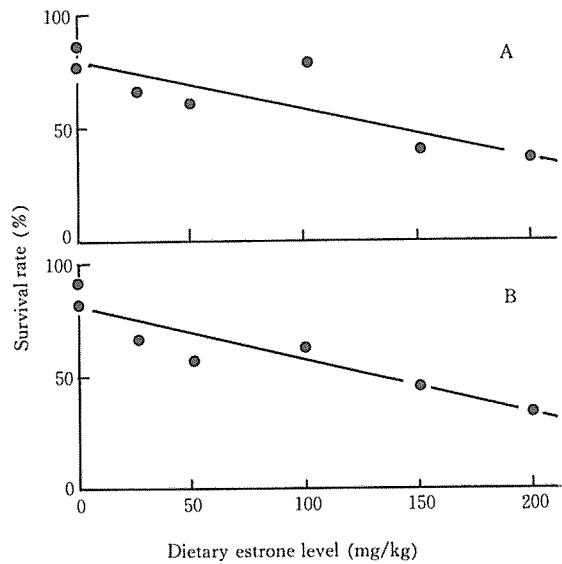


Fig. 3. Relationship between dietary estrone level and survival rate of the loach. A, circulating and filtering aquaria; B, experimental ponds.

かに肥大していた。

4. 考 察

本実験においてドジョウの性は、餌料 1 kg 当たり Es を 100 mg および 150 mg 添加したものを、ふ化後 14 日目から 40 日間与えた場合に 100 % 雌に転換した。一方、Es による他魚類で行われた結果をみると、処理の濃度と期間、性転換率は、メダカで 125 mg, 240 日間, 100 %¹⁾、同じく 100 mg, 26~28 日間, 効果的¹⁵⁾、キンギョで 100 mg, 60 日間, 100 %¹⁶⁾、ニジマスで 100 mg, 58 日間, 85 %¹⁷⁾、同じく 30~120 mg, 150 日間, 54 %¹⁸⁾、テラピアで 100 mg と 200 mg, 25~59 日間, 62~78 % であった¹⁹⁾。これらからすると、Es によるドジョウの性転換率はメダカおよびキンギョと同程度であり、ニジマスおよびテラピアよりも高いように思われる。

つぎに、雄における臀鰭長および胸鰭の骨質薄板長の体長に対する割合は、25 mg の Es 添加量で、また、背鰭、胸鰭、腹鰭の各長さの体長に対する割合は、50 mg の添加量で、それぞれ対照群よりも減少し、雌性化の傾向が認められた。これらの Es 添加量は、性転換に必要な Es 添加量の $\frac{1}{2}$ に相当する。山本は、メダカにおいて性転換をひきおこすに要する雄性ホルモンの服用量が、二次性徴を生じさせるに要する量の約 2~3 倍であることを報告している¹²⁾。これは本実験結果とほぼ一致している。

本実験において、性転換雌の成長度は遺伝的雌とほぼ同じであり、遺伝的雄よりも大きかった。しかし増重倍率は性転換雌を含む Es 添加量の多い群が、それを含まない Es 添加量の少ない群よりも小さかった。これは、減耗が Es 添加量の増加に伴って多くなったためである。雌性ホルモンの経口投与が魚類に及ぼす影響については次のような報告がある。すなわち、岡田¹⁷⁾は Es がニジマスの性分化に及ぼす影響について実験し、Es 処理 2 週目と 3 週目に斃死が集中し、この期の斃死が試験期間を通しての斃死の大半を占めることを見出した。そして Es の影響としては、肝臓と腎臓の肥大、細尿管の変性、鰓外壁と生殖腺上皮の肥厚をあげている。また、Johnstone ら²⁰⁾はカワマスで 20 mg/kg の estradiol の経口投与をした場合に、対照群よりも高い致死率を生じたという。さらに Sower ら²¹⁾は大西洋産サケ *Salmo salar* の生存率が 10 mg/kg の diethylstilbesterol および 20 mg/kg の estradiol では、それぞれ 14 % と 30 % で、対照群の 55 % よりも低い結果を得た。

一方、雄性ホルモンの経口投与が魚類に及ぼす影響につ

いては、Harbin ら²²⁾はニジマスで 17 α -メチルテストステロンの服用が、また、McGeachin ら²³⁾はテラピア *Oreochromis aureus* の雄性化に必要な 17 α エチニール テストステロン量の 4 倍量の経口投与が、それぞれ生存率に影響を与えないことを報告している。

以上を総合すると、雌性ホルモンの経口投与は、雄性ホルモンの場合と相違して、魚類の生存率に悪影響を及ぼすように思われる。しかし、筆者らはドジョウについての前実験¹³⁾で次の結果を得た。すなわち、ふ化後 12 日目から 56 日間、125 $\mu\text{g}/\text{l}$ と 250 $\mu\text{g}/\text{l}$ の Es 溶液に浸漬し、さらに 326 日間池水で飼育した群の、ふ化後 2 日目を基準とした生存率は、それぞれ 63 % と 70 % であり、一方、無処理群のそれは 53 % であった。そして増重倍率は、性転換が行われた 250 $\mu\text{g}/\text{l}$ Es 処理群では、対照群の 1.6 倍であった。さらに、その後の実験¹⁴⁾においても、Es 溶液に浸漬した群と浸漬しなかった群との間に一定の関係が認められなかった。このような Es 処理の方法が、生存率に差異を生ずる原因については不明であるが、Es の体内への吸収が経口投与の場合には消化管から、また、溶液中に浸漬する場合には鰓や皮膚などから、それぞれ行われることによるものと考えられる。

したがって、現時点では、Es の経口処理をドジョウ養殖にとり入れることは有効でなく、これについては、さらに研究が必要と思われる。

5. 要 約

ドジョウ稚魚にエストロン (Es) を経口的に与えた場合、その投与量が性転換率、成長度、減耗率および増重倍率に及ぼす影響を調査し、この方法がドジョウ養殖を行う場合に有効であるかどうかを検討した。結果は次のとおりである。

1. ドジョウの性は、ふ化後 14 日目から 40 日間、Es 100, 150 mg/kg 餌料を与えて、その後 11 か月間飼育した場合に 100 % 雌になった。
2. 雄の性徴形質は、性転換に必要なとする量よりも少ない量の Es で雌性化された。一方、雌の形態は、Es の投与量にはほとんど影響されなかった。
3. 奇形魚の出現率は、対照群では 2.9 % と 16.7 % に対して、Es 25~150 mg/kg 餌料の範囲では 0~27.3 % で、両者間に大きい差異が認められなかった。
4. Es 添加量 X (mg) と卵巣重量の体重に対する割合 Y (%) との関係は

$$Y = -0.024X + 22.085 \quad (r = -0.88)$$

の式で表わされ、成熟度指数は Es 添加量の増加に伴って減少した。

5. 性転換雌の平均体長および平均体重は、遺伝的雌とほぼ同じであり、遺伝的雄よりも大きかった。

6. Es 添加量 X (mg) と実験期間中における各群の増重倍率 Y との関係は

$$Y = -47.05X + 13426 \quad (r = -0.80)$$

の式で表わされ、増重倍率は Es 添加量の増加に伴って減少した。

7. Es 添加量 X (mg) と飼育期間中の各群の生存率 Y (%) との関係は

循環濾過式水槽では

$$Y = -0.21X + 79.65 \quad (r = -0.85)$$

実験池では

$$Y = -0.24X + 80.00 \quad (r = -0.92)$$

の式で表わされ、生存率は Es 添加量の増加に伴って低下した。

8. 現時点では、Es の経口処理をドショウ養殖にとり入れる事は、有効でない。

文 献

- 1) T. Yamamoto: *J. Exp. Zool.*, **123**, 571~594 (1953).
- 2) 山本時男: 動雑, **63**, 22~23 (1954).
- 3) 山本時男: 動雑, **65**, 176~177 (1956).
- 4) 山本時男: 動雑, **67**, 27 (1958).
- 5) T. Yamamoto: *J. Exp. Zool.*, **137**, 227~260 (1958).
- 6) 山本時男: 動雑, **69**, 33 (1960).
- 7) 山本時男・松田典子: 動雑, **70**, 33 (1961).
- 8) 山本時男: 動雑, **71**, 349 (1962).
- 9) 山本時男: 動雑, **72**, 346 (1963).
- 10) 岡田鳳二・松本春義・村上 豊: 昭和56年度日本水産学会春季大会講演要旨集, p. 33.
- 11) 北海道立水産孵化場: 第6回全国養鱒技術協議会要録, 26~30 (1981).
- 12) F. Tamazaki: *Aquaculture*, **33**, 329~354 (1983).
- 13) 久保田善二郎・大浜秀規: 水産大研報, **33**, 11~25 (1984).
- 14) 久保田善二郎・畠山 元: 水産大研報, **36**, 29~38 (1987).
- 15) R. Fineman: *J. Exp. Zool.*, **188**, 35~40 (1973).
- 16) T. Yamamoto and T. Kajishima: *J. Exp. Zool.*, **168**, 215~222 (1968).
- 17) 岡田鳳二: 孵化場研究報告, **28**, 11~17 (1973).
- 18) B. Jalabert, R. Billard and B. Chevassus: *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.*, **15**, 19~28 (1975).
- 19) M. M. Tayamen and W. L. Shelton: *Aquaculture*, **14**, 349~354 (1978).
- 20) R. Johnstone, T. H. Simpson, and A. F. Walker: *Aquaculture*, **18**, 241~252 (1979).
- 21) S. A. Sower, W. W. Dickhoff, T. A. Flagg, J. L. Mighell, and C. V. W. Mahnken: *Aquaculture*, **43**, 75~81 (1984).
- 22) R. Harbin, C. Whitehead, N. R. Bromage, G. Smart, R. Johnston, and T. Simson: *J. Endocrinol.*, **87**, 66~67 (1980).
- 23) R. B. McGeachin, E. H. Robinson, and W. H. Neil: *Aquaculture*, **61**, 317~321 (1987).