

第3章 生理的性の人為的統御

ヒラメの性分化の特性を明らかにし、その人為的統御方法を確立する目的で、飼育水温および性ステロイドの性分化へ及ぼす影響について調査した。すなわち、第1に、飼育水温が性分化に与える影響を調べ、飼育水温の制御による性分化の統御方法について検討した。第2に、性ステロイド処理による性分化の統御手法について検討した。

1. 飼育水温の制御による性分化の統御方法

第2章において、ヒラメは基本的に雄ヘテロ型（XX-XY型）の性決定機構を持ちながらも、性分化が不安定であることが明かとなった。そこで、飼育環境要因の性分化への影響を調査し、その制御による生理的性の統御が可能であるか検討した。本研究では、環境要因のうち、最も重要な飼育水温について検討した。

1) 飼育水温と性分化

性分化時期の飼育水温が性比に及ぼす影響について明らかにし、水温の制御による生理的性の統御方法を検討する目的で、遺伝的全雌群と遺伝的雌雄混合群について性分化時期を異なる水温で恒温飼育し、性比を調査した。

遺伝的全雌群として、第2極体放出阻止型雌性発生2倍体2群（作出群24および38）、第2極体放出阻止型雌性発生2倍体雄と通常雌の自然産卵群に由来する1群（作出群36）、および第1卵割阻止型雌性発生2倍体の次世代であるクローン1群（作出群57）の計4群を実験に供した。遺伝的雌雄混合群として、通常雌雄による次世代3群（作出番号28、37、および47）を実験に供した。

それぞれの作出群について、Table 11に示すような15.0℃から27.5℃の範囲にある一定水温飼育群を設けた。一定水温飼育の継続期間等もあわせてTable 11にまとめた。一定水温飼育期間以外は常温飼育し、飼育魚を育成後、各水温別飼育群の性比を調べた。

各飼育群の性比を同じくTable 11に示した。

遺伝的全雌群では、20.0℃、22.5℃、および17.5℃の飼育群で雌の割合は86.0%から97.2%の範囲で高く、雄の出現率が低かった。ところが、高水温の飼育群で顕著に雄の割合が増加し、とくに27.5℃の飼育群では雌の割合は0%ないし51.1%まで低下した。15.0℃の低水温の飼育群においても、雄の割合が増加する傾向が強く、雌の割合は74.6%ないし80.0%にやや減少した。このうち、遺伝的に均質なクローンである69-RT1~69-RT4の飼育群系列でも、同様な性比の変動がみられるとともに、3群で同一飼育群内に雌雄の両方が出現した。

遺伝的雌雄混合群では、20.0℃の飼育群で雌の割合は46.7%から53.3%の範囲にあり、ほぼ雌雄比1:1の雄の出現がみられ、遺伝的全雌群の場合とは明らかに異なった。高水温お

Table 11. Sex distribution of all XX rearing lots (24,36,38,57) and XX and XY mixed rearing lots (28,37,47) at various regimes of regulated rearing water temperature. RRWT, regime of regulated rearing water temperature; PRWTR, period expressed by ages (days after hatching) at the start and end of regulated water temperature rearing; TLRWTR, averages of total length at the start and end of regulated water temperature rearing; SRRWTR, survival rate in the period of regulated water temperature rearing; SS, sample size; PF, percentages of females.

No. and code of group	Code of rearing lot	Regulated water temperature rearing					Sex distribution		
		RRWT °C	PRWTR	TLRWTR mm	SRRWTR %	SS	♂	♀	PF
24 GI(N♀9)	24-RT1	15.0	36→140	14.3→81.2	51.0	55	11	44	80.0*
	24-RT2	20.0	36→100	14.3→94.0	66.0	85	6	79	92.9
	24-RT3	25.0	36→100	14.3→109.3	61.0	76	26	50	65.8*
28 N(N♀9)	28-RT1	15.0	36→140	14.1→76.7	45.5	44	34	10	22.7*
	28-RT2	20.0	36→100	14.1→95.4	70.5	44	23	21	47.7
	28-RT3	25.0	36→100	14.1→106.4	60.0	36	31	5	13.9*
36 F,SP(G1♂)	36-RT1	15.0	40→130	12.2→104.1	54.3	67	17	50	74.6*
	36-RT2	17.5	40→130	12.2→119.1	39.7	53	4	49	92.5
	36-RT3	20.0	40→90	12.2→94.5	75.8	71	8	63	88.7
	36-RT4	20.0	40→90	12.2→95.5	62.4	36	3	33	91.7
	36-RT5	22.5	40→90	12.2→103.6	73.8	52	6	46	88.5
	36-RT6	25.0	40→90	12.2→114.2	75.6	62	15	47	75.8*
	36-RT7	27.5	40→90	12.2→110.3	66.7	47	23	24	51.1*
37 NSP(N♀)	37-RT1	15.0	40→130	11.9→100.6	51.0	46	38	8	17.4*
	37-RT2	20.0	40→90	11.9→93.2	73.3	60	32	28	46.7
	37-RT3	25.0	40→90	11.9→107.4	67.7	53	32	21	39.6
38 GI(F,(G1♂2)♀1)	38-RT1	20.0	35→80	15.6→90.9	69.6	36	1	35	97.2
	38-RT2	27.5	35→75	16.0→92.5	53.4	36	36	0	0
47 N(F,(G1♂2)♀1)	47-RT1	20.0	35→80	14.3→86.4	58.0	45	21	24	53.3
	47-RT2	27.5	35→75	14.2→88.4	53.1	33	31	2	6.1*
57 HETCL(♀2•♀1)	57-RT1	20.0	35→90	11.2→67.1	53.3	50	7	43	86.0
	57-RT2	22.5	35→90	11.2→78.2	53.2	35	8	27	77.1
	57-RT3	25.0	35→90	11.2→84.9	50.1	33	23	10	30.3*
	57-RT4	27.5	35→90	11.2→67.4	66.7	33	33	0	0*

* : Significant difference from the female rate of 20.0°C rearing lot ($p < 0.01$).

よび低水温の飼育群での雄の割合の増加は遺伝的全雌群の場合と同様な傾向にあり、雌の割合は、27.5℃の飼育群で6.1%，15.0℃の飼育群で17.4%ないし22.7%まで減少した。

このように、性分化時期の飼育水温によってヒラメの性比は変動し、環境要因が性分化に大きな影響を及ぼすことが明らかとなった。20℃前後の飼育水温では、遺伝的雌（XX個体）の雄への性分化の転換の頻度は低く、雌へ分化する個体の割合は高く安定した。遺伝的雌の雄への性分化の転換は、とくに高水温条件下で促進され、低水温条件下でもその傾向が強かった。一方、遺伝的雌雄混合群ではいずれの飼育水温でも雌の割合はおよそ50%以下に限られ、飼育水温による遺伝的雄（XY個体）の雌への性分化の転換の可能性は低いことが示された。

2) 高水温が性分化に影響する時期

高水温が遺伝的雌の雄化を促すタイミングを明らかにする目的で、遺伝的全雌群について、性分化期である日齢40～90の異なる時期および期間に高水温飼育（27.5℃）を行ない、飼育群の性比を調査した。

第2極体放出阻止型雌性発生2倍体雄と通常雌の自然産卵群に由来する遺伝的全雌群（作出群38）を実験に用いた。

Table 12 に示すように、日齢40から90までの間（36-RT8では日齢95まで）、適水温（20.0℃）および高水温（27.5℃）の一定水温飼育を異なる期間の組合せで設定した飼育群系列（36-RT3, 36-RT4, 36-RT7～36-RT16）を育成し、性比を調べた。

各飼育群の性比を同じくTable 12に示した。

高水温飼育を日齢40（平均全長12.2mm）に開始した群（36-RT7, 36-RT12, 36-RT13）と、日齢50（19.7mm）に開始して日齢90（108.0mm）まで継続した群（36-RT14）では、高い頻度で雄への転換がみられた。一方、日齢70（50.6～50.8mm）以降に高水温飼育を開始した群（36-RT8, 36-RT9, 36-RT16）では雄の割合の増加はみられなかった。これらの中間の日齢60（31.9～32.2mm）に高水温飼育を開始した群（36-RT10, 36-RT15）と、高水温飼育期間が短い群（36-RT11）では、雄の割合の増加はわずかであった。

このように、高水温の性比への影響は、とくに全長12mmから30mm前後、およそ50mm以下の時期に高水温飼育を行なった群に限られ、この時期に遺伝的雌（XX個体）の性分化における高水温の感受期が存在することが明らかとなった。一方、20℃での飼育を遺伝的雌個体の着底期から全長50mmまでの期間継続することによって、雄への性分化の転換の頻度を低くおさえることが可能であることが判明した。

Table 12. Sex distribution of all XX rearing lots at various periods of regulated high watertemperature (27.5°C) rearing. All rearing lots were kept water temperature constantly low (20.0°C) from 40th day to 90th day after hatches except for the periods of high water temperature rearing. PHWTR, period expressed by ages (days after hatching) of high water temperature rearing; TLHWTR, averages of total length at the start and end of high water temperature rearing; SRHWTR, survival rate in the period of high water temperature rearing; SRRWTR, survival rate in the period of regulated water temperature (20.0 and 27.5°C) rearing; SS, sample size; PF, percentage of females.

No. and code of group	Code of rearing lot	High water temperature rearing						Sex distribution		
		PHWTR	TLHWTR	SRHWTR	SRRWTR	SS	♂ : ♀	PF		
36 F,SP(G1♂)	36-RT 3	—	—	—	75.8	71	8 : 63	88.7		
	36-RT 4	—	—	—	62.4	36	3 : 33	91.7		
	36-RT 8	80→95	70.5→109.6	95.8	58.6	29	3 : 26	89.7		
	36-RT 9	70→85	50.6→84.9	92.2	70.7	62	3 : 59	95.2		
	36-RT10	60→75	31.9→67.3	88.9	73.8	34	4 : 30	88.2		
	36-RT11	50→65	19.3→49.3	71.8	66.0	44	8 : 36	81.8		
	36-RT12	40→55	12.2→32.1	91.3	85.0	66	19 : 47	71.2*		
	36-RT13	40→70	12.2→69.9	71.5	70.8	55	25 : 30	54.5*		
	36-RT 7	40→90	12.2→110.3	66.7	66.7	47	23 : 24	51.1*		
	36-RT14	50→90	19.7→108.0	75.1	72.1	51	19 : 32	62.7*		
	36-RT15	60→90	32.2→106.7	86.5	68.7	33	6 : 27	81.8		
	36-RT16	70→90	50.8→101.1	96.8	65.9	55	6 : 49	89.1		

* Significant difference from the female rate of 20.0°C rearing lot (36-RT3, $p < 0.01$).

2. 性ステロイド処理による性分化の統御方法

魚類の生理的性を性ステロイド処理によって統御することが可能である (Yamamoto, 1969; Donaldson and Hunter, 1982; Yamazaki, 1983; 隆島・会田, 1984)。そこで、ヒラメの性分化の統御方法を確立する目的で、雄性ホルモンとして 17α -メチルテストステロン (MTと略記)、雌性ホルモンとしてエストラジオール- 17β (E_2 と略記)を用い、遺伝的雌の雄への転換方法、遺伝的雄の雌への転換方法、および遺伝的雌の雄への転換阻止方法について検討した。

1) 遺伝的雌の雄への転換方法

性転換雄の効率的な作出手法を明らかにする目的で、遺伝的雌の雄への性転換方法について、MTによる有効な浸漬処理濃度および経口投与濃度を求める実験を行なった。

(a) 浸漬処理濃度

MT処理による遺伝的雄の性分化の転換条件を明らかにする目的で、遺伝的全雌群について、MTの浸漬処理濃度と性比との関係を調べた。

遺伝的全雌群である第2極体放出阻止型雌性発生2倍体の作出群2例、すなわち、作出群6と24を実験に供した。作出群6では、1, 5, 10, 50, および100 ppbの異なる濃度でMT浸漬処理する飼育群系列(6-MT1~6-MT5)を設定した。作出群24では、5 ppbの濃度でMT浸漬処理する飼育群(24-MT1)を設定した。前者では日齢31、後者では日齢36にMT浸漬処理を開始し、いずれも日齢100まで処理を継続した。

各飼育群のヒラメのMT処理期間における成長と生残、および性比をTable 13に示した。

MT処理期間における生残率は、作出群6の飼育群系列で27.2%から51.1%の範囲でばらついた。しかし、たとえばMT処理の強度と生残率の低下に相関があるような、MT処理が直接的にそれらに影響したとみられる傾向は認められなかった。また、MT処理期間に、ヒラメは平均全長12 mmから71~95 mmに達した。

MT未処理の対照群では、飼育群6-1および飼育群24-1の両者とも、全雌とはならず、52.5%の雄が出現した。MT処理濃度1 ppbから10 ppbの飼育群でいずれも雄100%となった。処理濃度50 ppbの飼育群では雄の割合は80.0%で、ふたたび雌の出現がみられた。さらに、処理濃度100 ppbの飼育群では、雌の割合が著しく増加し、雄の割合は23.3%まで減少し、対照群より低率となった。

なお、6-MT5では、左右にそれぞれ卵巣と精巣を持つ雌雄同体の1個体が出現した。しかし、他のすべての雄個体では、精巣および輸精管にいかなる異常も認められなかった。また、満1歳時に調べたすべての雄個体で、精液の搾出が可能であった。その媒精によって作出した次世代は正常な生育を示した。一方、高濃度処理群に出現した雌では、卵巣は後方突起の短い奇形を示した。

Table 13. Sex distribution of all XX rearing lots at various dosage levels of 17α -methyltestosterone (MT) by immersing method. CMTT, concentration of MT treatment; DMTT, duration expressed by ages (days after hatching) at the start and end of MT treatment; TLMTT, averages of total length at the start and end of MT treatment; SRMTT, survival rate in the duration of MT treatment; SS, sample size; H, hermaphrodite; PM, percentage of males.

No. and code of group	Code of rearing lot	MT immersing treatment					Sex distribution				
		CMTT	DMTT	TLMTT	SRMTT	SS	♂	H	♀	PM	
		$\mu\text{g}/\ell$		mm	mm	%				%	
6 G1(N ♀4)	6-1	0				43.1	40	21	0	19	52.5
	6-MT1	1	31→100	12.0 → 85.4		41.3	30	30	0	0	100 *
	6-MT2	5	31→100	12.0 → 94.7		27.2	30	30	0	0	100 *
	6-MT3	10	31→100	12.0 → 95.2		36.9	30	30	0	0	100 *
	6-MT4	50	31→100	12.0 → 93.7		51.1	30	24	0	6	80.0 *
	6-MT5	100	31→100	12.0 → 85.0		29.3	30	7	1	22	23.3
24 G1(N ♀9)	24-1	0				34.5	40	21	0	19	52.5
	24-MT1	5	36→100	14.3 → 71.0		22.0	21	21	0	0	100 *

* : Significantly larger value than the male rate of control rearing lot ($p < 0.01$).

このように、ヒラメの遺伝的雌（XX個体）を生理的雄に誘導するMT浸漬処理濃度は、1 ppbから10 ppb（下限不明）であることが明らかとなった。

(b) 経口投与濃度

MT処理による遺伝的雌の性転換条件を明らかにする目的で、遺伝的全雌群について、MTの経口投与濃度と性比との関係を調べた。

遺伝的全雌群である第2極体放出阻止型雌性発生2倍体雄と通常雌の自然産卵に由来する作出群60を実験に供した。0.01, 0.1, 1, 10, および100 ppmの異なる濃度のMTを含有する配合飼料を性分化時期に投与する飼育群系列（60-MT1～60-MT5）を設定した。日齢46にMT経口投与を開始し、いずれも日齢90まで投与を継続した。対照群として、MT未投与の飼育群（60-1）を設定した。

各飼育群のヒラメのMT投与期間における成長と生残、および性比をTable 14に示した。

MT処理期間における生残率は、各飼育群で36.3%から54.9%の範囲でばらついたが、MT投与が直接的にそれらに影響したとみられる傾向は認められなかった。MT投与期間に、ヒラメは平均全長15 mmから63～65 mmに達した。

MT未投与の対照群である飼育群6-1では、全雌とはならず、45.2%の雄が出現した。MT投与濃度0.01 ppmの飼育群ですでに雄の割合は94.1%まで増加した。投与濃度0.1 ppmおよび1 ppmの飼育群でいずれも雄100%となった。投与濃度10 ppmの飼育群でも雄の割合は95.6%で高率であったが、ふたたび雌の出現がみられた。さらに、投与濃度100 ppmの飼育群では、雌の割合が著しく増加し、雄の割合はわずかに7.7%まで減少し、対照群より著しく低率となった。なお、投与濃度100 ppmの飼育群では、すべての雌で、卵巣は後方突起の短い奇形を示した。

このことから、ヒラメの遺伝的雌（XX個体）を高頻度で生理的雄に誘導するMT経口投与濃度は、0.01 ppmから10 ppm（下限不明）のきわめて広範囲に及ぶことが明らかとなった。

2) 遺伝的雄の雌への転換方法

E₂処理による遺伝的雄の性分化の転換条件を明らかにする目的で、通常ヒラメの性分化への雌性ホルモンによる影響を調査し、通常ヒラメの直接的な雌性化方法を検討した（山本ら、1991）。

(a) 経口投与濃度

遺伝的雌雄混合群について、E₂の経口投与濃度と性比との関係を調べた。

通常ヒラメの作出群2例、すなわち作出群28と35を実験に供した。両群とも、それぞれ、0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, および10 ppm（作出群35では0.03～3 ppm）の異なる濃度でE₂

Table 14. Sex distribution of all XX rearing lots at various dosage levels of 17 α - methyltestosterone (MT) by dietary method. Abbreviations as in Table 13.

No. and code of group	Code of rearing lot	MT oral treatment				Sex distribution			
		CMTT $\mu\text{g/g}$	DMTT	TLMTT mm	SRMTT %	SS	♂ : ♀	PM	%
60 F,SP(G1 ♂)	60-1	0		14.8 → 64.8	54.9	73	33 : 40		45.2
	60-MT1	0.01	46 → 90	15.0 → 62.9	36.3	51	48 : 3		94.1*
	60-MT2	0.1	46 → 90	15.0 → 65.0	46.0	56	56 : 0		100*
	60-MT3	1	46 → 90	14.9 → 63.0	49.0	52	52 : 0		100*
	60-MT4	10	46 → 90	14.6 → 63.0	51.1	68	65 : 3		95.6*
	60-MT5	100	46 → 90	15.2 → 64.7	47.7	65	5 : 60		7.7

* : Significantly larger value than the male rate of control rearing lot ($p < 0.01$).

を経口投与する飼育群系列 (28-E₂2~28-E₂7, 35-E₂1~35-E₂5) を設定した。作出群 28 の系列では、日齢 36 にE₂ 処理を開始し、日齢 100 まで継続した。作出群 35 の系列では、日齢36 にE₂ 処理を開始し、日齢 85 まで継続した。

各飼育群のヒラメのE₂ 処理期間における成長と生残、および性比をTable 15 に示した。

作出群 28 の飼育群系列では、変態完了直後 (日齢 40~55) の斃死が特に多く、生残率の著しく低い群が目立った。これは、生物餌量からE₂ 含有の配合飼料への転換が順調にできず、小型個体の餌不足による衰弱と、残餌による飼育環境の悪化によるものであった。一方、作出群 35 の飼育群系列では生残は比較的良好であった。成長および生残にE₂ の投与濃度が直接影響したと判断される傾向は認められなかった。E₂ 投与期間に、ヒラメは平均全長14~16 mm から 69~81 mmに達した。

E₂ 未処理の対照飼育群およびE₂ 投与濃度 0.3 ppm以下の飼育群では、雌の割合は 50 % を越えることはなく、雌雄比 1 : 1 と差のない雄の出現がみられた。1 ppmの投与群で雌の割合は 90.0 %および 93.3 %に増加し、3 ppmおよび 10 ppmの投与群で雌 100 %となった。

このように、遺伝的雄 (XY 個体) を高頻度で生理的雌に誘導するE₂ の経口投与濃度は 1 ppm以上であり、通常ヒラメの全雌化には 3 ppm から 10 ppm (上限不明) の投与が必要であることが明らかとなった。

3) 遺伝的雌の雄への転換阻止方法

E₂ 処理による遺伝的雌の雄への転換阻止方法を確立する目的で、E₂ による有効な浸漬処理濃度および経口投与濃度を求める実験を行なうとともに、E₂ の有効な浸漬処理時期について検討した。

(a) 浸漬処理濃度

E₂ の浸漬処理による遺伝的雌の性分化の転換阻止条件を明らかにする目的で、遺伝的全雌群について、E₂ の処理濃度と性比との関係を調べた。

遺伝的全雌群である第 2 極体放出阻止型雌性発生 2 倍体の作出群 12 を実験に供した。0.1, 0.5, 1, 5, および 10 ppbの異なる濃度でE₂ 浸漬処理する飼育群系列 (12-E₂1~12-E₂5) を設定した。日齢 36 から日齢 80 までE₂ 浸漬処理を継続した。

各飼育群のヒラメのE₂ 処理期間における成長と生残、および性比をTable 16 に示した。

E₂ 処理期間の各飼育群の生残率は 21.7 %から 39.5 %の範囲でばらついたが、E₂ 処理による特定のヒラメの選択的死亡の傾向はうかがわれなかった。成長についてもE₂ 処理による影響をうかがわせる傾向性は認められなかった。E₂ 処理期間に、ヒラメは平均全長 14 mm から 50~59 mmに達した。

E₂ 未処理の飼育群である12-1 および12-2 では、雌の割合はそれぞれ 70.0 %および 57.1 %であり、雄が 3, 4 割程度出現した。処理濃度 0.5 ppb以下の12-E₂1 および12-E₂2 では、

Table 15. Sex distribution of XX and XY mixed rearing lots at various dosage levels of estradiol-17 β (E₂) by dietary method. CE₂T, concentration of E₂ treatment; DE₂T, duration expressed by ages (days after hatching) at the start and end of E₂ treatment; TLE₂T, averages of total length at the start and end of E₂ treatment; SRE₂T, survival rate in the duration of E₂ treatment; SS, sample size; PF, percentage of females.

No. and code of group	Code of rearing lot	E ₂ oral treatment				Sex distribution		
		CE ₂ T $\mu\text{g/g}$	DE ₂ T	TLE ₂ T mm	SRE ₂ T %	SS	♂ : ♀	PF %
28 N(N♀9)	28-1	0	36 → 100	14.1 → 76.3	1.0	2	1 : 1	50.0
	28-E ₂ 2	0.03	36 → 100	14.1 → 80.0	6.0	4	2 : 2	50.0
	28-E ₂ 3	0.1	36 → 100	14.1 → 69.3	15.0	12	6 : 6	50.0
	28-E ₂ 4	0.3	36 → 100	14.1 → 75.6	6.0	4	3 : 1	25.0
	28-E ₂ 5	1.0	36 → 100	14.1 → 69.6	12.5	10	1 : 9	90.0
	28-E ₂ 6	3.0	36 → 100	14.1 → 65.3	13.5	10	0 : 10	100
	28-E ₂ 7	10.0	36 → 100	14.1 → 63.1	13.0	9	0 : 9	100
35 N(N♀14)	35-1	0	36 → 85	15.8 → 82.5	36.3	18	15 : 3	16.7
	35-E ₂ 1	0.03	36 → 85	15.7 → 73.9	40.0	18	12 : 6	33.3
	35-E ₂ 2	0.1	36 → 85	16.5 → 81.6	33.8	23	14 : 9	39.1
	35-E ₂ 3	0.3	36 → 85	15.9 → 81.0	50.0	31	17 : 14	45.2
	35-E ₂ 4	1.0	36 → 85	16.0 → 78.2	33.8	15	1 : 14	93.3*
35-E ₂ 5	3.0	36 → 85	16.4 → 72.6	38.8	20	0 : 20	100 *	

* : Significantly larger value than the female rate of control rearing lot ($p < 0.01$).

Table 16. Sex distribution of all XX rearing lots at various dosage levels of estradiol-17 β (E₂) by immersing method. Abbreviations as in Table 15.

No and code of group	Code of rearing lot	E ₂ oral treatment				Sex distribution			
		CE ₂ T $\mu\text{g}/\ell$	DE ₂ T	TLE ₂ T mm	SRE ₂ T %	SS	♂	♀	PF %
12 G1(N ♀7)	12-1	0		14.3 → 50.1	34.1	40	12	28	70.0
	12-2	0		14.3 → 51.7	37.6	42	18	24	57.1
	12-E ₂ 1	0.1	36 → 80	14.3 → 57.1	21.7	25	8	17	68.0
	12-E ₂ 2	0.5	36 → 80	14.3 → 51.7	32.0	35	8	27	77.1
	12-E ₂ 3	1.0	36 → 80	14.3 → 56.0	30.7	34	1	33	97.1*
	12-E ₂ 4	5.0	36 → 80	14.3 → 52.1	27.5	31	0	31	100 *
	12-E ₂ 5	10.0	36 → 80	14.3 → 59.6	39.5	47	0	47	100 *

* : Significantly larger value than the female rate of control rearing lot ($p < 0.01$).

雌の割合は 68.0 %および 77.1 %で、対照群との差はわずかであり、雌の割合の増加は認め難かった。処理濃度 1 ppb の 12-E₂3 では、雌の割合は 97.1 %で、雄への転換がほぼ阻止された。雄の出現は群中の小型の 1 個体に限られた。E₂ 処理濃度 5 ppb 以上の飼育群である 12-E₂ 4 および 12-E₂ 5 では、雌 100 %となった。

このように、遺伝的雌 (XX 個体) の雄への転換を阻止する有効な E₂ の浸漬処理濃度はほぼ 1 ppb から 10 ppb (上限不明) であることが明らかとなった。

(b) 経口投与濃度

E₂ の経口投与による遺伝的雌の性分化の転換阻止条件を明らかにする目的で、遺伝的全雌群について、E₂ の投与濃度と性比との関係を調べた (山本ら, 1991)。

遺伝的全雌群である第 2 極体放出阻止型雌性発生 2 倍体の作出群 2 例、すなわち作出群 24 および 29 と、同じく第 2 極体放出阻止型雌性発生 2 倍体雄と通常雌の次世代である作出群 34 を実験に供した。いずれの群とも、それぞれ、0.03, 0.1, 0.3, および 1 ppm の異なる濃度で E₂ を経口投与する飼育群系列 (24-E₂3 ~ 24-E₂6, 29-E₂2 ~ 29-E₂5, 34-E₂1 ~ 34-E₂4) を設定した。各系列とも、Table 17 に示したように、日齢 36 ないし 46 に E₂ 投与を開始し、日齢 80 ないし 100 まで継続した。

各飼育群のヒラメの E₂ 処理期間における成長と生残、および性比を Table 17 に示した。

作出群 24 に由来する処理群では、日齢 55 以前に稚魚の斃死が多く、低い生残率が目立った。作出群 29 および 34 の処理系列では、生残率は高かった。E₂ 処理期間の斃死状況から、E₂ 処理による特定のヒラメの選択的死亡の傾向はうかがわれなかった。成長についても E₂ 処理による影響をうかがわせる傾向性は認められなかった。E₂ 投与期間に、ヒラメは平均全長 14 ~ 21 mm から 65 ~ 80 mm に達した。

E₂ 未処理の対照の各飼育群では、雌の割合は 43.8 %ないし 58.3 %であり、雄が 5 割程度出現した。いずれの系列でも E₂ 投与濃度 0.03 ppm の投与群で雌の割合は 70.0 %ないし 85.7%まで増加した。E₂ 投与濃度 0.1, 0.3, および 1 ppm の投与群では、ほぼ雌 100 %となり、雄の出現は 34-E₂ 3 の 1 個体に限られた。

このように、遺伝的雌 (XX 個体) の雄への性分化の転換を阻止し、雌性化を促進するための E₂ の有効な経口投与濃度は、0.1 ppm から 1 ppm (上限不明) であることが明らかとなった。

Table 17. Sex distribution of all XX rearing lots at various dosage levels of estradiol-17 β (E₂) by dietary method. Abbreviations as in Table 15.

No. and code of group	Code of rearing lot	E ₂ oral treatment				Sex distribution		
		CE ₂ T $\mu\text{g}/\ell$	DE ₂ T	TLE ₂ T mm	SRE ₂ T %	SS	♂ : ♀	PF %
24 G1(N ♀9)	24-1	0		14.3 → 75.4	34.5	40	21 : 19	47.5
	24-E ₂ 3	0.03	36 → 100	14.3 → 71.8	19.5	21	3 : 18	85.7*
	24-E ₂ 4	0.1	36 → 100	14.3 → 72.0	20.0	17	0 : 17	100*
	24-E ₂ 5	0.3	36 → 100	14.3 → 70.7	29.0	29	0 : 29	100*
	24-E ₂ 6	1.0	36 → 100	14.3 → 70.6	18.5	26	0 : 26	100*
29 G1(N ♀10)	29-1	0		20.9 → 65.5	67.7	32	18 : 14	43.8
	29-E ₂ 2	0.03	46 → 80	21.2 → 69.7	52.7	20	6 : 14	70.0
	29-E ₂ 3	0.1	46 → 80	21.2 → 64.8	61.8	29	0 : 29	100*
	29-E ₂ 4	0.3	46 → 80	21.1 → 67.3	56.4	21	0 : 21	100*
	29-E ₂ 5	1.0	46 → 80	21.2 → 70.8	67.3	31	0 : 31	100*
34 F1(G1 ♂5)	34-1	0		20.7 → 76.9	48.6	24	10 : 14	58.3
	34-E ₂ 1	0.03	41 → 80	20.6 → 77.3	54.3	22	5 : 17	77.3
	34-E ₂ 2	0.1	41 → 80	20.2 → 80.5	51.4	24	0 : 24	100*
	34-E ₂ 3	0.3	41 → 80	20.4 → 76.3	45.7	21	1 : 20	95.2*
	34-E ₂ 4	1.0	41 → 80	20.4 → 74.6	52.9	22	0 : 22	100*

* : Significantly larger value than the female rate of control rearing lot (p<0.01).

(c) ホルモン処理時期

E₂ 処理による遺伝的雌の性分化の転換阻止のタイミングを明らかにする目的で、遺伝的全雌群について、E₂ の浸漬処理時期と性比との関係を調べた。

遺伝的全雌群である第2極体放出阻止型雌性発生2倍体の作出群6を実験に供した。日齢21～50, 36～65, 51～80, および66～95にE₂ の浸漬処理を期間をずらして30日間ずつ行なう飼育群系列(6-E₂2～6-E₂5)を設定した。E₂ の浸漬処理は、10 ppbの濃度で行なった。E₂ 未処理の通常飼育群6-1を対照群とした。

各飼育群のヒラメのE₂ 処理期間における成長と生残、および性比をTable 18に示した。

E₂ 処理を日齢36から65まで行った飼育群6-E₂3では、実験当初より糸状菌症による影響があり、生残率がふ化後50日目までに急速に低下した。それぞれの飼育群のE₂ 処理期間における生残率には成長段階の相違に由来する差が著しいが、育成期間を通算した生残率(25.3%～40.0%)にバラツキは比較的小さく、ホルモン処理の期間の相違が直接的にヒラメの生残に影響した可能性は低いようであった。一方、成長では早期にホルモン処理を施した飼育群でやや劣った。

E₂ 未処理の飼育群6-1では、雌の割合は47.5%であり、約半数の雄が出現した。日齢36から65まで、および同じく51から80までE₂ 処理を継続した飼育群である6-E₂3および6-E₂4では、それぞれ平均全長16.6 mmから39.0 mmまで、および同じく28.4 mmから63.8 mmまでの育成期間にE₂ 処理を継続したことになった。両群では、雌の割合はそれぞれ91.7%および94.4%であり、高い雌の出現率が得られた。その前の期間の処理群である6-E₂2では、平均全長8.6 mmから24.9 mmまでの育成期間にE₂ 処理を継続したことになり、雌の割合は78.0%で、やや高かった。最も遅い期間の処理群である6-E₂5では、平均全長38.4 mmから89.7 mmまでの育成期間にE₂ 処理を継続したことになり、雌の割合は64.4%で、低率であった。

このように、全長28 mmから39 mmの期間を中心にして、早期に、ヒラメの性分化のうえで、E₂ 処理による遺伝的雌(XX個体)の雄への転換阻止のための重要なポイントがあることが明らかとなった。

Table 18. Sex distribution of all XX rearing lots at various dosage periods of estradiol - 17 β (E_2) by immersing method. Abbreviations as in Table 15.

No. and code of group	Code of rearing lot	E ₂ immersing treatment				Sex distribution			
		CE ₂ T	DE ₂ T	TLE ₂ T	SRE ₂ T	SS	♂ : ♀	PF	
		$\mu\text{g}/\ell$		mm	mm	%		%	
6 G1(N ♀4)	6-1	0	—	—	—	—	40	21 : 19	47.5
	6-E ₂ 2	10.0	21 → 50	8.6 → 24.9	93.5	50	50	11 : 39	78.0*
	6-E ₂ 3	10.0	36 → 65	16.6 → 39.0	38.4	48	48	4 : 44	91.7*
	6-E ₂ 4	10.0	51 → 80	28.4 → 63.8	40.2	54	54	3 : 51	94.4*
	6-E ₂ 5	10.0	66 → 95	38.4 → 89.7	63.4	50	50	18 : 32	64.4

* : Significantly larger value than the female rate of control rearing lot ($p < 0.01$).

4. 考 察

ヒラメは性分化時期の飼育水温によって性比の顕著な変動を示した。これは、遺伝的全雌群および遺伝的雌雄混合群の飼育水温と性比との関係 (Fig.1) から、遺伝的雌 (XX個体) の雄への転換に起因していることが明らかである。すなわち、20 °C前後の飼育水温では、雌の割合は高く、遺伝的雌の雄への性分化の転換の頻度は低かった。しかし、高水温条件下で遺伝的雌の雄への性分化の転換は高い頻度で起こり、低水温条件下でもその傾向が強かった。一方、遺伝的雌雄混合群である通常ヒラメはどの水温条件でも雌の割合が有意に 50 %を上回ることではなく、飼育水温が遺伝的雄 (XY個体) の雌への性分化の転換を誘起する可能性は低いことが示唆された。また、遺伝的に均質なクローン (遺伝的全雌群) の飼育群系列においても、同様な性比の変動がみられるとともに、20 °Cの適温飼育群内にも雌雄の両方が出現した。このことは、遺伝的雌の本来の生理的雌への性分化は遺伝的に安定しておらず、環境要因が個体毎の性分化に微妙でありながらもきわめて大きな影響を与えることを示している。

このように、遺伝的雌は環境要因の影響によって容易に性分化の転換を生じるのに対して、遺伝的雄はその影響を受けにくく、雄への性分化の過程は雌の場合とは対称的に遺伝的に安定していると考えられる。このことは、雄ヘテロ型の性決定様式では、本来の性は雌であり、雄が発生の過程で誘導される性であるとする説 (大野, 1979 ; 山崎, 1989) によく一致している。

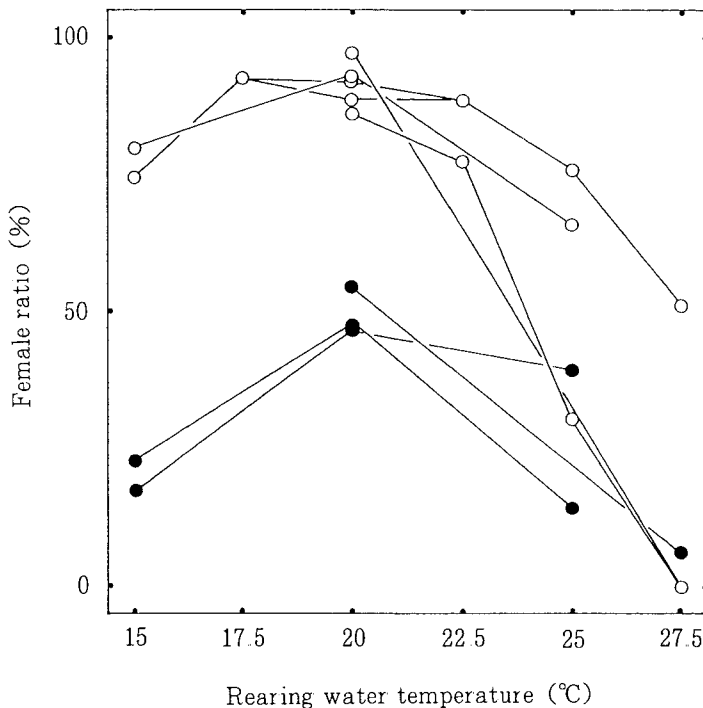


Fig.1. Female ratio at various regimes of regulated rearing water temperature. Open circles represent all XX rearing lots. Solid circles represent XX and XY mixed rearing lots.

すなわち、ヒラメでは、遺伝的雄は雄への分化を決定する遺伝的裏づけを有するがゆえに性分化が安定している一方、遺伝的雌は雌が遺伝的方向づけを欠く本来の性であるがゆえに正常な性分化が変更され易いのであろう。しかし、高水温や低水温が、単に雌化の阻害要因であるのか、直接的に雄への誘導に働くのかは明らかではない。

高水温が遺伝的雌の雄化を促すタイミングについては、高水温の性比への影響が、とくに全長 12 mm から 30 mm 前後を中心に、およそ 50 mm 以下の時期を含んで高水温飼育を行なった群に限られ、この時期に遺伝的雌の性分化における高水温の感受期が存在することが明らかとなった。この時期の生殖腺は、卵巣における生殖細胞の減数分裂が開始するかなり以前で、未分化期ないし体細胞性要素の発達による形態的な卵巣への分化がようやく開始される頃である。また、全長 32.2 mm で高水温飼育を開始した群で雄への転換の頻度は低く、このことはすでにこの時点で性分化に影響を及ぼす高水温の感受性を失った個体が多いことを意味する。従って、高水温は、遺伝的雌の形態的に未分化な生殖腺に作用し、雄への分化の方向づけに関与すると考えられる。すなわち、生殖腺は、形態的な分化にさきだち、早期から生理的な性分化を開始しており、その時期に温度感受期が一致していることが示唆された。

このように、ヒラメは飼育水温が性分化に関与することできわめて特異であるが、温度が性決定を左右する例は爬虫類や両棲類では珍しくない現象である(村松, 1984)。さらに、魚類においては、水温が性分化に影響を与える例がカダヤシ科の *Poeciliopsis lucida* (Sullivan and Schultz, 1986) やトウゴロウイワシ科の *Menidia menidia* (Conover and Kynard, 1981; Conover, 1984; Conover and Fleiser, 1986; Conover and Heins, 1987; Conover and van Voorhees, 1990) など報告されている。とくに、後者での研究は詳細に行なわれ、高水温で雄の割合が増加し、低水温では雌の割合が多いこと、親魚によって子孫の性比の変動の状況が異なり、遺伝的背景があること、温度感受期は組織学的に判定できる性分化期にさきかけて存在し、性ステロイド感受期と一致すること、および水温による性比の変動は生態戦略上重要な意義を有することなどが示されている。これらにはヒラメの状況と共通する点が少なくない。しかし、このような魚類についても、水温が性分化に関与する機序の詳細については明らかにされていない。

いずれにしても、20 °C 前後の適水温での恒温飼育を変態後の着底期から全長 50 mm 前後までの期間継続すれば、ヒラメの遺伝的雌を高率で雌に誘導し、雄への性転換を効率的に阻止できる。一方、性分化時期の高水温飼育は、遺伝的雌を高率で雄に転換させ、性ステロイドを用いない性転換雄の作出方法として有用である。このように、ヒラメでは、飼育水温の制御によって遺伝的雌の性分化の統御が可能であることが判明した。

性転換雄の効率的な作出方法の確立を目的として、遺伝的全雌群を材料に、MT 処理による遺伝的雌の雄への性転換方法について検討した。その結果、ヒラメの遺伝的雌を高頻度で生理的雄に誘導する MT 処理濃度は、浸漬処理では 1 ppb から 10 ppb (下限不明) であり、経口投与では 0.01 ppm から 10 ppm (下限不明) のきわめて広範囲に及ぶことが判明した。また、MT 処理の継続期間は全長 15 mm から 63 mm までで有効であった。田畑 (1991) も、第 2 極体放出阻止型雌性発生 2 倍体について、全長 29 mm から 114 mm までの期間、1 ppm ないし 10

ppmのMTの経口投与を行なうことによって、ほぼ全雄に誘導できたことを報告している。これは今回得られた有効処理濃度範囲の中に含まれる結果である。岡田(1985)は、ニジマスにおいて、MTの至適経口投与濃度が0.5 ppmから1 ppmの狭い範囲に限られ、それをはずれた高濃度処理でも、低濃度処理でも、雄への転換率は著しく低下することを報告している。ヒラメの場合は有効な濃度範囲がきわめて広く、このことはヒラメの遺伝的雌の性分化が非常に不安定であることに関連し、低い濃度のMTにも遺伝的雌が高い応答性を示した結果であると思われる。すなわち、温水性の魚類であるメダカ(Yamamoto, 1958, 1968)、キンギョ(Yamamoto and Kajishima, 1968)、およびティラピア類(Clemens and Inslee, 1968; Guerrero, 1975; Nakamura, 1975; Tayamen and Shelton, 1978)では、有効経口投与濃度が20 ppmから60 ppmであることが知られ、ヒラメの上限濃度をやや上回っている。また、サケ科魚類(Yamazaki, 1976; Johnstone *et al.*, 1978; Okada *et al.*, 1979; 岡田, 1985)では0.5 ppmから3 ppmのより低い有効経口投与濃度が知られているものの、これもヒラメにおける有効範囲のむしろ高濃度側に位置している。一方、ゼブラフィッシュでは1 ppmから100 ppmの比較的広い有効濃度範囲を示し(Yamazaki, 1976)、また、クローン群に雄が出現することが報告されている(Streisinger *et al.*, 1981)。これらはいずれの事柄でもヒラメと共通しており、両種は性分化の特性においても類似している可能性が示唆される。なお、ヒラメは、浸漬処理では100 ppb、経口投与では100 ppmの高濃度処理で、雌の出現率が対照群を越え、著しく高まった。これは高濃度の雄性ホルモンが生体内で芳香化されて雌性ホルモンに転換されることによる逆説的な効果に起因するものと判断される(高橋, 1978; 山崎, 1989)。

遺伝的雄の雌への転換方法について、 E_2 の有効な経口投与濃度を求める目的で、遺伝的雌雄混合群の E_2 の経口投与濃度と性比との関係を調べた。その結果、遺伝的雄を高頻度で生理的雌に誘導する E_2 の経口処理濃度は1 ppm以上であり、通常ヒラメの全雌化には3 ppmから10 ppm(上限不明)の投与が必要であることが明らかとなった。このときの E_2 処理の継続期間は全長16 mmから63 mmまでで有効であった。田中(1988)は、通常ヒラメについて、全長19.3 mmから61.8 mmないし94.6 mmまでの期間、0.1~100 ppmの E_2 を経口投与し、1 ppm以上の投与濃度で全雌に誘導できたことを報告している。また、田畑(1989a, 1991)は、通常ヒラメについて、全長11 mmから90 mmまでの期間、1 ppbまたは10 ppbの E_2 の浸漬処理に続いて1 ppmまたは10 ppmの E_2 の経口投与を行なうことによって、全雌に誘導できたことを報告している。これらの結果は、いずれも共通しており、再現性の高いものと判断できる。他魚種における遺伝的雄の雌への転換には、アメリカナマズ(Goudie *et al.*, 1983)では60 ppm、イエローパーチ(Mailson *et al.*, 1986)では15~120 ppm、およびサケ科魚類(Johnstone *et al.*, 1978; Goetz *et al.*, 1979)では10 ppmから20 ppmの E_2 の有効投与濃度が報告されており、ヒラメの有効値はこれらよりやや低い。

一方、ヒラメは通常の飼育群にも環境要因による性転換雄が様々な割合で出現するが、遺伝的雌の E_2 処理による性分化の転換阻止条件を明らかにする目的で、遺伝的全雌群について、 E_2 の処理濃度と性比との関係を調べた。その結果、ヒラメの遺伝的雌をほぼ100%生理的雌に誘導する E_2 処理濃度は、浸漬処理では1 ppbから10 ppb(上限不明)であり、経口投与

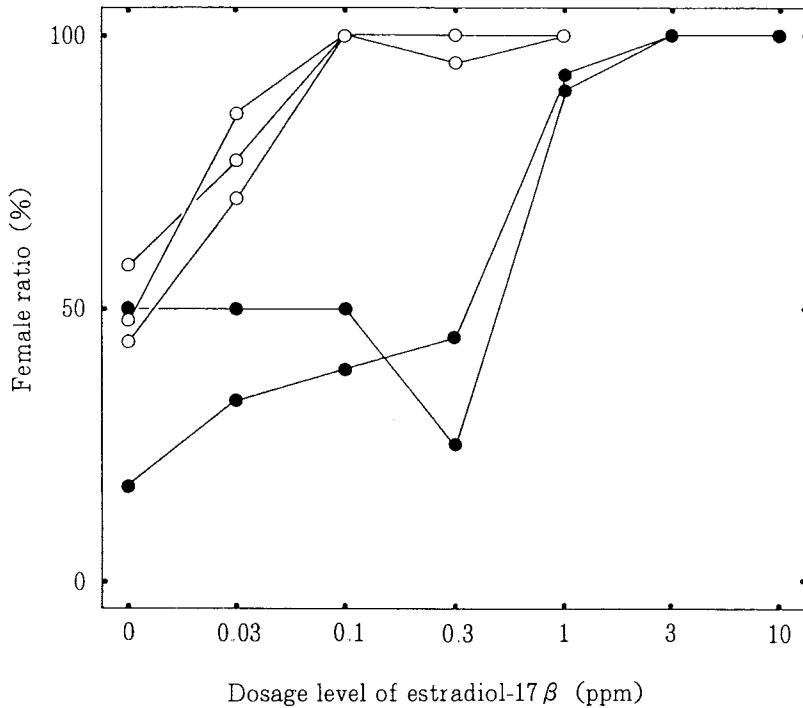


Fig. 2. Female ratio at various dosage levels of estradiol-17β by dietary method. Open circles represent all XX rearing lots. Solid circles represent XX and XY mixed rearing lots.

では 0.1 ppm から 1 ppm (上限不明) であることが明らかとなった。また、このときの E_2 処理の継続期間は全長 21 mm から 52 mm までで有効であった。このことから、遺伝的雌を全雌に誘導するには、通常ヒラメを全雌に誘導するより 1 桁低い E_2 の経口投与濃度で可能であることが明らかとなった (Fig. 2)。すなわち、0.1 ppm および 0.3 ppm の低い濃度の E_2 の経口投与は、遺伝的雌の雄への性分化の転換の阻止には有効であるが、遺伝的雌の雌への転換には有効ではない。また、田畑 (1989a, 1991) は、通常ヒラメについて、様々な濃度での E_2 の浸漬処理実験を行なっているが、全雌群を得るには至っておらず、遺伝的雌の雌への転換は E_2 の浸漬処理によって得られる処理強度では困難のようである。このことも、遺伝的雌の雄への転換の阻止が E_2 の浸漬処理で容易に達成されることと相違している。従って、0.3 ppm の濃度での E_2 の経口投与および 10 ppb の濃度での E_2 の浸漬処理は、第 2 章において「性転換阻止レベル」と称して適用したように、遺伝的雌の雄への性転換による性比への影響を排除し、任意の群の本来の遺伝的性比を知るための方法として有効であると考えられる。

E_2 処理による遺伝的雌の性分化の転換阻止のタイミングについては、性転換阻止レベルの E_2 の浸漬処理時期と遺伝的全雌群の性比との関係の調査から、全長 28 mm から 39 mm の期間を中心にして、より早期に重要なポイントが存在することが明らかとなった。これは、将来の卵巣においては体細胞性要素の発達による形態的な分化が進展する時期であるが、後に構築される精巣においては未分化期ないし形態分化がようやく開始される時期に相当する。また、全

長 38 mmでE₂ 処理を開始した群では、すでに雄への転換阻止が不能であった。このことは、遺伝的雌が雄への分化を開始した後では、性転換阻止レベルのE₂ 処理ではこれを雌への分化に引戻すことができないことを意味している。従って、このレベルのE₂ 処理は、精巣への形態的分化が始る以前の遺伝的雌の未分化な生殖腺に作用し、環境要因によって及ぼされる影響に拮抗することによって、精巣への分化を阻止し、卵巣への分化を促進するものと考えられる。このタイミングが性転換を誘導する水温の感受期とおよそ一致していることも、上記の考えの妥当性を示唆している。

このように、性ステロイド処理によるヒラメの性分化の統御方法について知見を収集することができた。MT処理による遺伝的雌の雄への性転換方法およびE₂ 処理による遺伝的雄の雌への性転換方法を明らかにするとともに、低濃度のE₂ 処理によって遺伝的雌の雄への性分化の転換の阻止が可能であり、後者は遺伝的性比を判定するための手法としても有効であることが確認された。なお、性転換雄の効率的作出方法としての性ステロイド処理は産業的にも有用であるが、養殖用の雌性化種苗の生産に性ステロイド処理を直接適用するには、法的規制や安全性等、社会的な問題が存在している。従って、ヒラメの養殖用種苗の作出における性分化の統御には、飼育水温の制御による方法が適用されるべきである。