

鳥取県水産試験場報告

第34号 1995年（平成7年）12月

ヒラメの人為的性統御とクローン集団作出に関する研究 山本栄一 1

ヒラメの人為的性統御とクローン集団作出に関する研究*¹

山 本 栄 一*²

Studies on Sex-manipulation and Production of Cloned Populations in Hirame Flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel)

Eiichi YAMAMOTO

Summary

Major objects of the present study were to develop manipulation techniques for controlling genetic and physiological sex as well as to establish breeding techniques for applying cloned populations to aquaculture in hirame flounder, which is one of the most commercially important cultured species in Japan.

1. **Sex-differentiation:** The morphological process of sex-differentiation was histologically examined. The results showed that fry and post-metamorphic larvae were sexually undifferentiated. Distinction between the ovary and the testis was possible based on morphogenesis in somatic elements in the gonad at about 27 to 37 mm in total length. Meiotic division was first recognized in the ovary of a 69 mm (total length) size specimen and in the testis of a 129 mm size specimen.

2. **Genetic sex-determination and its manipulation:** Sex ratio was examined in gynogenetic diploids and their progeny to clarify genetic sex-determination in hirame flounder. Examinations of the sex ratio in groups which were treated with estradiol-17 β (E₂) so

* 1 : 本論文は北海道大学審査学位論文である (The present work is a dissertation that was submitted as a partial fulfillment of the requirements for Doctor's degree in Fisheries Science at Hokkaido University in 1995).

* 2 : 鳥取県水産試験場, 栽培漁業部 (Tottori Prefectural Fisheries Experimental Station, Division of Cultural Fisheries, Ishiwaki, Tomari, Tohaku-gun, Tottori Prefecture 689-06, Japan).

as to inhibit spontaneous sex reversal revealed that this species had the male heterogametic sex determination (XX female—XY male). Therefore, I propose the induction of gynogenetic diploids as well as the hybridization between normal females (XX) and sex-reversed males (XX) as effective methods to achieve all-female populations. The sex-reversed males were produced by artificial sex-reversal from gynogenetic diploids as well as normal diploid females. However, sex-differentiation of genetic female (XX) seemed to be so unstable that spontaneous sex-reversal from genetic females to physiological males occurred.

3. Manipulations of physiological sex: The influence of environmental factors and sex-steroid treatments was examined to enable artificial control of physiological sex in hirame flounder. In the present study, water temperature during the period of sex-differentiation was proven to influence physiological sex of genetic females. When the genetic females were reared under high water temperature (25.0~27.5°C) conditions, sex reversal to physiological males was frequently induced. The same tendency was observed for rearing under low water temperature (15°C). The susceptible period for sex-reversal from genetic females to physiological males was from 12 mm to 30 mm in total length. Therefore, rearing under high water temperature conditions is concluded to be applicable for sex-manipulation. Stable rearing at a constant temperature (20°C) in the stages from the settlement to 50 mm in total length was quite effective in inhibiting spontaneous sex-reversal towards males. However, genetic males have never been sex-reversed to physiological females by control of water temperature.

The effects of sex-steroids on sex-differentiation in the hirame flounder were carefully examined in order to control physiological sex. Optimum doses for immersion and oral administration of 17 α -methyltestosterone to induce sex-reversal towards males from genetic females were 1~10 ppb (the minimum dose was unknown) and 0.01~10 ppm (the minimum dose was unknown), respectively. Effective doses for oral administration of E₂ to induce sex-reversal towards females from genetic males were 3~10 ppm (the maximum dose was unknown). Low doses less than 0.3 ppm had no effect on sex-reversal. Effective doses for immersion and oral administration of E₂ to inhibit spontaneous sex-reversal from genetic females to physiological males were more than 0.1 ppm and 1 ppb, respectively. Oral administration of E₂ treatments with 0.1~0.3 ppm was not effective in reversing sex from genetic males towards physiological females, but did inhibit spontaneous sex-reversal to physiological males. The susceptible period for E₂ treatment to block spontaneous sex-reversal was the stage between 28 and 39 mm in total length.

4. Large-scale production of all-female seedlings and their growth performances: Growth performances were compared between female and male hirame flounder, in order to elucidate the usefulness of mono-sex populations in the aquaculture of this species. The sex-manipulating techniques were optimized based on maturation characteristics of hirame, and effective production of feminized seedlings was attempted.

Comparison between the sexes within artificially cloned populations revealed that females achieved better growth than males, namely 1.8 times (445 day-old fish) and 2.9 times (773 day-old fish) higher in females than in males of average body weight. The results strongly suggest the effectiveness of mono sex aquaculture using all-female seedlings.

Histological examinations of gonadal development showed that males matured for the first time at one year after birth and females at two years old. Vitellogenesis began two months prior to the spawning period. Judging from egg-compositions in the ovary, the ovarian development was considered to be of the asynchronous type. On the basis of individual spawning experiments, it was revealed for the hirame flounder that the same female spawned almost every day for about three months during the spawning season. Therefore, natural spawning in the tank is felt to be more convenient to obtain fertilized eggs than artificial fertilization. Natural spawnings in the tank containing normal females and sex-reversed males resulted in large-scale production of all-female progeny (genetically XX). This result also suggests that normal copulating behaviour of sex-reversed males after natural spermiation might occur in the rearing tank. Spontaneous sex-reversal towards physiological males was then inhibited in the resultant XX progeny by rearing them in stable water temperature at 20°C during the sex-differentiation period. By the above mentioned steps, feminized seedlings were successfully produced on a semi-large scale and exhibited high efficiency in growth performances, because of the quite high percentages of females in the population.

5. Production of cloned population and its application for genetic improvements: In experiments aimed to produce mitotic gynogenetic diploids by blocking the first cleavage, an increase in deformed fry and a quite low survival rate of embryos were frequently observed. The mitotic gynogenetic diploids exhibited expansion of variances in some quantitative characteristics. Complete homozygosity was clearly verified in the surviving mitotic gynogenetic diploids by using isozyme gene marker.

In cloned fish which had been produced by the second cycle of the meiotic gynogenesis in the eggs of the first generation of complete homozygous gynogens, a better survival rate of fries was often observed. Cloned fish exhibited smaller variances in some characteristics. Genetic identity within a cloned population was confirmed not only by tissue-grafting to examine histocompatible genes, but also by multilocus-DNA-fingerprinting to detect minisatellite loci.

Hybridization between females and sex-reversed males within a cloned population resulted in the second generation of the same clone, suggesting successful maintenance of clonal lines from generation to generation. The appearance of the fish obtained by natural spawning in the tank including females and males from a cloned populations suggests the possibility of large-scale production of cloned fishes.

Hybridization between a female and a male from different two cloned populations resulted in a genetically identical heterozygous cloned population, which exhibited better survival, growth and disease resistance than the homozygous clones. Therefore, heterozygous clones are considered more applicable for aquaculture. In conclusion, it is felt that homozygous clones, which were fixed for certain specific characteristics, are quite useful as broodstocks and the resultant heterozygous clones produced by crossing two different clones are more advantageous for commercial aquaculture. The time required for genetic improvements must be shortened by new techniques for producing cloned populations.

目 次

緒 言	6
材料と方法	9
結 果	16
第1章 ヒラメの性分化過程	16
1. 性的未分化期	16
2. 卵巣の分化過程	17
3. 精巣の分化過程	18
4. 考 察	19
第2章 遺伝的性決定とその人為的統御	20
1. 雌性発生 2 倍体の性比	20
1) 第 2 極体放出阻止型雌性発生 2 倍体の性比	20
2) 第 1 卵割阻止型雌性発生 2 倍体の性比	22
2. 通常の飼育群に出現した雌性発生 2 倍体雄の後代の性比	22
1) 第 2 極体放出阻止型雌性発生 2 倍体雄の後代の性比	22
2) 第 1 卵割阻止型雌性発生 2 倍体雄の次世代の性比	25
3. 人為的性転換魚の次世代の性比	25
1) 全雄に誘導した第 2 極体放出阻止型雌性発生 2 倍体の次世代の性比	25
2) 全雄に誘導した通常ヒラメの次世代の性比	25
4. 考 察	29
第3章 生理的性的人為的統御	34
1. 飼育水温の制御による性分化の統御方法	34
1) 飼育水温と性分化	34
2) 高水温が性分化に影響する時期	36
2. 性ステロイド処理による性分化の統御方法	38
1) 遺伝的雌の雄への転換方法	38
(a) 浸漬処理濃度	38
(b) 経口投与濃度	40
2) 遺伝的雄の雌への転換方法	40
(a) 経口投与濃度	40
3) 遺伝的雌の雄への転換阻止方法	42
(a) 浸漬処理濃度	42
(b) 経口投与濃度	45
(c) ホルモン処理時期	47

3. 考 察	49
第4章 雌性化種苗の大量生産方法と成長特性	54
1. ヒラメの生殖および産卵周期	54
1) 生殖周期	54
(a) 雌の生殖周期	54
(b) 雄の生殖周期	57
2) 産卵周期	59
2. 自然産卵による雌性化種苗の生産方法	62
1) 性転換雄と通常雌の自然産卵による全雌卵の大量作出	62
2) 産出卵による種苗生産	64
3. 雌雄の成長差と雌性化種苗の成長特性	65
1) クローン集団内での雌雄の成長差	65
2) 性転換雄の次世代の雌性化種苗の成長特性	70
4. 考 察	72
第5章 クローン集団の作出と育種利用	76
1. 完全同型接合体の作出と特性	76
1) 第1卵割阻止型雌性発生2倍体の作出と特性	76
2) アイソザイムによる完全同型接合体作出の確認	78
2. クローン集団の作出と特性	81
1) 第1卵割阻止型雌性発生2倍体の次世代によるクローン集団の作出と特性	81
2) 組織移植によるクローン集団作出の証明	86
3) DNAフィンガープリントによるクローン集団作出の証明	88
3. クローン集団の増殖方法	88
1) クローン集団内雌雄の交配による増殖	88
2) 自然産卵によるクローン集団の増殖	91
4. ホモ型クローンとヘテロ型クローンの比較	94
1) 変態期前後の仔稚魚期の成長と生残の比較	94
2) 作出から生後半年間の成長と生残の比較	96
3) 0歳および1歳魚の生残状況の比較	99
5. 考 察	100
第6章 総 括	105
要 約	109
謝 辞	111
引用文献	112
図 版	121

緒 言

ヒラメ (*Paralichthys olivaceus*) は、日本周辺海域から東シナ海にかけて分布する浅海性のカレイ目魚類であり、沿岸漁業で漁獲される高価格魚である。これは栽培漁業の重要な対象魚種で、日本各地で増殖対策が施されている。一方、近年は養殖も非常に盛んに行なわれるようになってきている。1991年の全国の統計では、放流用のヒラメの人工種苗は2,210万尾生産されたが、養殖用の種苗もこれに匹敵する1,881万尾が生産されている。これは、海産魚では、マダイに次いで2番目に多い種苗の生産数である。養殖ヒラメの全国の生産高は、統計に初めて記録された1983年では648tであるが、1988年では3,097tまで急増し、さらにその後の3年間で6,515t (1991年) に倍増している。これは1991年の天然ヒラメの漁獲量である6,276tを上回る生産量であり、ヒラメが増々重要な養殖対象魚種になってきたことを示している。

ヒラメの種苗生産に関する研究は原田ら (1966) に始まり、安永 (1971, 1972, 1975) の基礎的な研究に次いで、平本・小林 (1979) および平本ら (1980) により大量生産技術の開発がなされた。この技術をもとに、1980年代に全国各地に設立された栽培漁業センターでは、ヒラメの大量種苗生産および放流事業が行なわれるようになった。研究論文としては十分に報告されていないものの、事業の推進の過程で技術改良が重ねられ、現在では種苗生産技術は高いレベルに達している。その普及も著しく、養殖用種苗の7割は民間で生産されるまでに至っている。一方、ヒラメ養殖の技術的な点については、原田 (1980, 1981) および熊井 (1990) による解説がある。しかし、ヒラメ養殖そのものが歴史の浅い試みであり、民間養魚家の現場での経験的な技術応用が主体で、養殖の効率を根本的に変革するような技術開発は未だなされていない。

養殖の効率化を図るためには、育種学的手法は重要なもののひとつである。ヒラメ養殖が進展する中で、ヒラメは雌雄による成長差が著しく、雌の成長が雄を上回ることが判明した (原田ら, 1983; 中本・小野山, 1985)。実際に、雄の成長停滞は養殖効率をそこなうのみならず、ヒラメの大型魚生産の障害になっている。従って、ヒラメにおいては、種苗の雌への性統御がきわめて有用である。また、現状のヒラメ養殖では、ほぼ野生種に等しい種苗が養殖対象となり、養殖の効率化には品種改良の必要性が大きい。しかし、従来の方法による選抜育種では、品種改良に長い時間と莫大な経費や施設を要し、育種効率を飛躍的に高める新しい技術の開発が求められている。

魚類の人為的性統御の研究は、Yamamoto (1953) の性ステロイド処理でメダカの遺伝的雄 (XY) を機能的雌に転換した報告に始った。さらに、性転換雌 (XY) と通常雄 (XY) の交配によって、超雄 (YY) が作出され、F₂世代に全雄群が得られることと、遺伝的雌 (XX) を機能的雄に性転換させ、通常雌との交配によってF₁世代に全雌群が得られることが報告された (Yamamoto, 1955, 1958)。このような性ステロイド処理による性転換魚の作出と、その後代における単性魚群の作出は、その後、キンギョ (Yamamoto and Kajishima, 1968; Yamamoto, 1975)、ティラピア (Clemens and Inslee, 1968)、グッピー (Takahashi, 1975a, b)、およびサケ科魚類 (Okada *et al.*, 1979; Jhonstone *et al.*, 1979; Hunter *et al.*, 1982;

Jhonstone and Youngson 1984 ; 岡田, 1985) などで行なわれ, 実験魚のみならず, 産業的に重要な魚種にも応用された. このような手法については, Yamamoto (1969), Donaldson and Hunter (1982), および Yamazaki (1983) による総説がある.

このうち, Yamazaki (1983) は, 魚類の性を生理的性と遺伝的性に大別し, それぞれの統御方法について解説した. さらに, 遺伝的性の統御を直接的に行なうには染色体操作による雌性発生などの利用が有効であり, これに生理的性の統御を組合せることで, 上述の単性魚群の作出手法をより効率的に実施できることを示した. また, このような性統御手法は, 魚類の変化に富んだ性決定機構の解明においても適用可能であることも述べている.

第2極体放出阻止型雌性発生2倍体が全雌になる例は, コイ (Nagy *et al.*, 1978 ; Gomelsky *et al.*, 1979), ソウギョ (Stanley, 1976), ニジマス (Chourrout and Quillet, 1982), ギンザケ (Refstie *et al.*, 1982), ドジョウ (Suzuki *et al.*, 1985), およびアマゴ (臼田, 1989) などで報告され, これらの魚種では性決定遺伝子型が雄ヘテロ型 (XX-XY 型) であることが確認されている. 臼田 (1989) は第2極体放出阻止型雌性発生2倍体を性ステロイド処理で全雄に誘導し, 検定交配を必要とせず, 性転換雄を作出し, 後代における全雌大量生産を可能とした.

また, 雌性発生2倍体は純系の短期作出手法としての利用が検討されてきた. 純系は形質が単一化し, 遺伝子構成がホモ接合になっている個体群のことで, これを作出することは育種の重要な課題のひとつである. ちなみに, マウスの近交系の作出には兄妹交配を20世代繰り返すことが必要であり, その時点で近交系数が98.6%となり, 98~99%の遺伝子座がホモ接合型になるといわれている (田口, 1981).

通常の第2極体放出阻止型雌性発生2倍体は, 卵核染色体の倍化を第2減数分裂阻止で行なうために, 第1成熟分裂時の交叉に由来する組み換え型の出現により, ヘテロ接合型の遺伝子座を持ち, 完全同型接合体にはならない (Purdom, 1969). しかし, 当初は, 組み換え型の出現頻度は比較的 low であると思われ, 近交系の短期作出に第2極体放出阻止型雌性発生2倍体も利用可能であると考えられていた (Purdom, 1976, 1983 ; 小野里, 1983). ところが, 組み換え型の出現頻度の研究が進むと, その頻度は高く, 第2極体放出阻止型雌性発生2倍体の利用は魚類の近交系の短期作出手法として優れたものではないことが判明した (Thorgaard *et al.*, 1983 ; Allendorf and Leary, 1984 ; Guyomard, 1984 ; 谷口, 1986).

一方, 第1卵割阻止型雌性発生2倍体は, 卵核染色体の倍化を体細胞分裂阻止で行なうために, すべての遺伝子座がホモ接合型の完全同型接合体になる. すなわち, 遺伝的純化が1世代で達成される. その次世代をふたたび雌性発生で作出すると, その世代は親と遺伝的に均質な完全同型接合体のクローンとなる. 従って, 第1卵割阻止型雌性発生2倍体は有用形質の固定などその育種利用においてきわめて有効である. しかし, 第1卵割阻止型雌性発生2倍体を利用したクローンの作出は, 第1卵割阻止が容易ではなく, ゼブラフィッシュ (Streisinger *et al.*, 1981), メダカ (Naruse *et al.*, 1985), アユ (Han *et al.*, 1991), およびコイ (Komen *et al.*, 1991) などわずかな成功例が報告されているにすぎない.

田畑は, ヒラメの染色体操作に関する一連の研究 (田畑ら, 1986a, 1986b ; 田畑・五利江,

1987a, 1987b, 1987c; 田畑, 1988; 田畑・五利江, 1988a, 1988b; 田畑, 1989a, 1989b, 1989c; 田畑ら, 1989; 田畑, 1991; Tabata, 1991) を通じて, 染色体操作技術を確立するとともに, 雌性発生 2 倍体および 3 倍体の飼育特性について調査し, さらに人為的性統御手法についても検討し, 評価すべき多くの知見を得ている。しかし, 人為的性統御においては, ヒラメの性決定機構が十分に明らかにされたとは言い難く, 技術的な完成をみるには至っていない。また, 第 1 卵割阻止型雌性発生 2 倍体の作出には成功しているものの, クローン世代は得られず, その育種利用については検討されていない。

本研究の目的は, 上述のように, 染色体操作による雌性発生を活用して, ヒラメの人為的性統御技術を開発するとともに, クローンを利用した育種技術を検討することである。本研究は, 田畑の研究とほぼ時を同じくして並行的に進められてきたものであるが, その中で, 人為的性統御の基本となるヒラメの性決定機構の解明および雌性化種苗の量産に関して異なるアプローチを試みるとともに, クローン集団を作出してその育種利用を検討し, 新たな多くの知見を加えることができた (山本, 1992a, 1992b)。そのために設定した主要な五つの課題は次のとおりである。

- 1) ヒラメの性分化過程: ヒラメの性分化過程を観察し, 性分化時期を明らかにする。
- 2) 遺伝的性決定とその人為的統御: 各種作出群の性比調査をもとに, ヒラメの遺伝的性決定機構を明らかにし, 遺伝的性の人為的統御を可能とする。
- 3) 生理的性の人為的統御: 環境要因および性ステロイドがヒラメの性分化に与える影響を明らかにし, 生理的性の人為的統御を可能とする。
- 4) 雌性化種苗の大量生産方法と成長特性: ヒラメの成熟特性に適合した性統御技術を検討し, 雌性化種苗の生産を試行するとともに, 雌性化種苗の成長特性を把握する。
- 5) クローンの集団作出と育種利用: ヒラメのクローン集団を作出し, その特性調査などを通じて, クローンを利用した育種技術を検討する。

材 料 と 方 法

1. 供試魚, 作出群, および飼育群

本研究では, 鳥取県沿岸で採捕された天然ヒラメから2ないし3世代目にあたる通常の養成親魚の雌5個体と雄3個体を元親とし, 1986年および1987年の実験群の作出に供試した。1987年の一部の作出例以降では, 本研究の作出群中の養成魚を親魚として用いた。

Table 1に, 本研究における種々作出群に通し番号およびコードを付し, その一覧を示した。各作出群は, 染色体操作による雌性発生の誘起, 通常の人工受精, および雌雄親魚の水槽内における自然産卵によって得られたものである。作出群それぞれの作出方法と, 雌雄親魚の組合せおよび親魚の由来についても, Table 1にまとめた。

本研究では, 種々作出群について, ヒラメの性決定機構の解明等を目的とした様々な飼育実験を行なった。その際の飼育群についても, Table 1にそれぞれのコードでまとめた。

Table 1の作出群のコードは, その作出種類別の略号と括弧内に示した作出群の親魚の個体別略号の組合せによって表現した。作出種類別の略号は, G1 (染色体操作による第2極体放出阻止型雌性発生2倍体の誘導群), G2 (同じく第1卵割阻止型雌性発生2倍体の誘導群), F₁, F₂ (示された雄親魚と, 通常雌等との交配による次世代, および次々世代), N (示された雌親魚と, 通常雄との交配による対照の次世代), そして, HOMCL, HETCL (ホモ型クローンおよびヘテロ型クローン, 第5章) であり, SP (自然産卵による作出群) を加えたものもある。また, 括弧内の親魚の個体別略号は, その群を特徴づける雄親または雌親について, 上述の略号で表したうに, 作出種類ごとに通し番号を付して個体の区別を行なった。

Table 1の飼育群のコードは, 作出群の通し番号に, 同一作出群内での飼育群の番号をハイフンで付加えることによって示した。通常の常温による飼育群では番号(数字)のみを付したが, ステロイド処理や飼育水温の制御を行なった群では, E₂ (エストラジオール-17 β 処理群), MT (17 α -メチルテストステロン処理群), およびRT (水温制御飼育群) の略号を加え, それぞれに番号を付した。

2. 親魚の飼育および採卵方法

親魚の飼育には基本的に容量5t以上の陸上水槽を用いた。常温による流水飼育を行ない, 冷凍のマアジまたはイカナゴを給餌した。雌親魚数に対し, 2倍以上の雄親魚を同時に飼育し, 産卵期に水槽内での活発な自然産卵を促した。

染色体操作および雌雄の個別の交配による作出では, 人工受精が必要であり, 上述の親魚群の雌個体から搾出採卵によって得た卵を使用した。精液については, より小規模な飼育群中の雄親魚からも得ることができ, 等調法または乾導法で卵に媒精した。

自然産卵による作出では, 上述の飼育方法による産卵群から生み出される卵を飼育排水とともにゴース製ネットで受け, 集卵し, 使用した。産卵群の産卵状況の調査においては, 産卵期

Table 1. Summary of groups produced and rearing lots in this study. G1, G2 and N represent gynogenetic diploids induced by retaining the second polar body, gynogenetic diploids induced by suppressing the first cell cleavage and normal diploids, respectively.

No. and code of group	Method of producing	Paternal parent	Maternal parent	Date of producing lot	Number of rearing lot	Code number of rearing lot
1 G1(N♀1)	Gynogenesis	UV milt of hirame flounder	N♀1(from a cultured stock)	1986.4.25	1	1-1
2 N(N♀1)	Crossing	N♂ (from a cultured stock)	ditto		1	2-1
3 G1(N♀2)	Gynogenesis	UV milt of hirame flounder	N♀2(from a cultured stock)	1986.4.30	5	3-1~4, 3-E ₂ 1
4 N(N♀2)	Crossing	N♂ (from a cultured stock)	ditto		2	4-1, 4-E ₂ 1
5 F ₁ (G1♂1)	Crossing	G1♂1(from 3-1)	N♀3(from a cultured stock)	1987.4.23	2	5-1, 5-E ₂ 1
6 G1(N♀4)	Gynogenesis	UV milt of hirame flounder	N♀4(from a cultured stock)	1987.4.25	11	6-1, 6-E ₂ 1~5, 6-MT1~5
7 N(N♀4)	Crossing	N♂ (from a cultured stock)	ditto		1	7-1
8 F ₁ (G1♂2)	Crossing	G1♂2(from 3-1)	N♀5(from a cultured stock)	1987.4.25	2	8-1, 8-E ₂ 1
9 N(N♀5)	Crossing	N♂ (from a cultured stock)	ditto		2	9-1, 9-E ₂ 1
10 F ₁ (G1♂3)	Crossing	G1♂3(from 3-1)	N♀6(from 2-1)	1988.5.2	2	10-1, 10-E ₂ 1
11 N(N♀6)	Crossing	N♂♂ (n=5, from 2-1)	ditto		2	11-1, 11-E ₂ 1
12 G1(N♀7)	Gynogenesis	UV milt of hirame flounder	N♀7(from 2-1)	1988.5.7	7	12-1, 12-2, 12-E ₂ 1~5
13 F ₁ (G1♂4)	Crossing	G1♂4(from 1-1)	ditto		2	13-1, 13-E ₂ 1
14 F ₁ (G1♂2)	Crossing	F ₁ (G1♂2)♂1(from 8-1)	ditto		2	14-1, 14-E ₂ 1
15 N(N♀7)	Crossing	N♂♂ (n=5, from 2-1)	ditto		2	15-1, 15-E ₂ 1
16 G1(G1♀1)	Gynogenesis	UV milt of hirame flounder	G1♀1(from 1-1)	1988.5.7	1	16-E ₂ 1
17 N(G1♀1)	Crossing	N♂♂ (n=5, from 2-1)	ditto		2	17-1, 17-E ₂ 1
18 F ₁ SP(G1♂)	Spawning	G1♂♂ (n=15, from 3-1,3-2)	N♀♀ (n=5, from 2-1)	1989.3.23	2	18-1, 18-E ₂ 1
19 F ₁ (G1MT♂1)	Crossing	G1MT♂1(from 6-MT1)	N♀8(from 2-1)	1989.4.14	1	19-E ₂ 1
20 F ₁ (G1MT♂2)	Crossing	G1MT♂2(from 6-MT1)	ditto		1	20-E ₂ 1
21 F ₁ (G1MT♂3)	Crossing	G1MT♂3(from 6-MT1)	ditto		1	21-E ₂ 1
22 F ₁ (G1MT♂4)	Crossing	G1MT♂4(from 6-MT1)	ditto		1	22-E ₂ 1
23 N(N♀8)	Crossing	N♂♂ (n=5, from 2-1)	ditto		1	23-E ₂ 1

Table 1. (continued).

No. and code of group	Method of producing	Paternal parent	Maternal parent	Date of producing lot	Number of rearing lot	Code number of rearing lot
24 G1(N♀9)	Gynogenesis	UV milt of mada1	N♀9(from 2-1)	1989.4.15	11	24-1, 24-RT1~3, 24-E ₂ 1~6, 24-MT1
25 F ₁ (G1MT♂5)	Crossing	G1MT♂5(from 6-1)	ditto		1	25-E ₂ 1
26 F ₁ (G1MT♂6)	Crossing	G1MT♂6(from 6-1)	ditto		1	26-E ₂ 1
27 F ₁ (G1MT♂7)	Crossing	G1MT♂7(from 6-1)	ditto		1	27-E ₂ 1
28 N(N♀9)	Crossing	N♂♂(n=5, from 2-1)	ditto		11	28-1, 28-RT1~3, 28-E ₂ 1~7
29 G1(N♀10)	Gynogenesis	UV milt of mada1	N♀10(from 2-1)	1989.4.21	6	29-1, 29-E ₂ 1~5
30 G2(N♀10)	Gynogenesis	UV milt of mada1	ditto		2	30-1, 30-E ₂ 1
31 N(N♀10)	Crossing	N♂♂(n=5, from 2-1)	ditto		1	31-E ₂ 1
32 G2(N♀11)	Gynogenesis	UV milt of mada1	N♀11(from 2-1)	1989.4.21	2	32-1, 32-E ₂ 1
33 G2(N♀12)	Gynogenesis	UV milt of mada1	N♀12(from 2-1)	1989.4.21	1	33-E ₂ 1
34 F ₁ (G1♂5)	Crossing	G1♂5(from 3-1)	N♀13(from 2-1)	1989.5.19	5	34-1, 34-E ₂ 1~4
35 N(N♀14)	Crossing	N♂♂(n=5, from 2-1)	N♀14(from 2-1)	1989.6.12	7	35-1, 35-E ₂ 1~5, 35-MT1
36 F ₁ SP(G1♂)	Spawning	G1♂♂(n=15, from 3-1, 3-2)	N♀♀(n=5, from 2-1)	1990.3.30	20	36-1, 36-RT1~18, 36-E ₂ 1
37 NSP(N♀)	Spawning	N♂♂(n=15, from 2-1)	N♀♀(n=5, from 2-1)	1990.3.30	5	37-1, 37-RT1~3, 37-E ₂ 1
38 G1(F ₁ (G1♂2)♀1)	Gynogenesis	UV milt of mada1	F ₁ (G1♂2)♀1(from 8-1)	1990.5.7	4	38-1, 38-RT1, 38-RT2, 38-E ₂ 1
39 F ₁ (G2♂1)	Crossing	G2♂1(from 32-1)	ditto		2	39-1, 39-E ₂ 1
40 F ₁ (G2♂2)	Crossing	G2♂2(from 32-1)	ditto		2	40-1, 40-E ₂ 1
41 F ₁ (G2♂3)	Crossing	G2♂3(from 30-1)	ditto		1	41-E ₂ 1
42 F ₁ (NMT♂1)	Crossing	NMT♂1(from 35-MT1)	ditto		1	42-E ₂ 1
43 F ₁ (NMT♂2)	Crossing	NMT♂2(from 35-MT1)	ditto		1	43-E ₂ 1
44 F ₁ (NMT♂3)	Crossing	NMT♂3(from 35-MT1)	ditto		1	44-E ₂ 1
45 F ₁ (NMT♂4)	Crossing	NMT♂4(from 35-MT1)	ditto		1	45-E ₂ 1
46 F ₁ (NMT♂5)	Crossing	NMT♂5(from 35-MT1)	ditto		1	46-E ₂ 1
47 N(F ₁ (G1♂2)♀1)	Crossing	N♂♂(n=5, from 2-1)	ditto		4	47-1, 47-RT1, 47-RT2, 47-E ₂ 1

Table 1. (continued).

No. and code of group	Method of producing	Paternal parent	Maternal parent	Date of producing	Number of rearing lot	Code number of rearing lot
48 HOMCL(G2♀1)	Gynogenesis	UV milt of madai	G2♀1(from 30-E ₂ 1)	1991.4.19	2	48-1, 48-MT1
49 HOMCL(G2♀2)	Gynogenesis	UV milt of madai	G2♀2(from 32-E ₂ 1)	1991.4.22	2	49-1, 49-MT1
50 HOMCL(G2♀3)	Gynogenesis	UV milt of madai	G2♀3(from 30-1)	1991.4.26	2	50-1, 50-MT1
51 HOMCL(G2♀4)	Gynogenesis	UV milt of madai	G2♀4(from 30-1)	1991.4.26	1	51-1
52 HOMCL(G2♀5)	Gynogenesis	UV milt of madai	G2♀5(from 32-E ₂ 1)	1991.4.27	1	52-1
53 HETCL(♀5•♂1)	Crossing	G2♂1(from 32-1)	ditto	1991.4.27	1	53-1
54 G2(F ₁ (G1♂2)♀1)	Gynogenesis	UV milt of madai	F ₁ (G1♂2)♀1(from 8-1)	1991.5.16	2	54-1, 54-E ₂ 1
55 F ₁ (G1♂2)	Crossing	F ₁ (G1♂2)♂2(from 8-1)	ditto	1991.5.16	1	55-E ₂ 1
56 HOMCL(G2♀2)	Crossing	HOMCL(G2♀2)♂1(from 49-MT1)	G2♀2(from 32-E ₂ 1)	1992.5.12	2	56-1, 56-2
57 HETCL(♀2•♂1)	Crossing	HOMCL(G2♀1)♂1(from 48-MT1)	ditto	1992.5.12	6	57-1, 57-2, 57-RT1~4
58 HOMCL(G2♀6)	Gynogenesis	UV milt of madai	G2♀6(from 30-1)	1992.5.14	0	
59 HOMCL(G2♀7)	Gynogenesis	UV milt of madai	G2♀7(from 32-1)	1992.5.14	1	59-1
60 F ₁ SP(G1♂)	Spawning	G1♂♂(n=30, from 8-1,3-2)	N♀♀(n=10, from 2-1)	1993.3.28	8	60-1, 60MT1~5, 60-RT1, 60-RT2
61 HOMCL(G2♀8)	Gynogenesis	UV milt of madai	G2♀8(from 54-1)	1993.4.26	1	61-1
62 HOMCL(G2♀9)	Gynogenesis	UV milt of madai	G2♀9(from 54-1)	1993.4.26	1	62-1
63 HOMCLSP(G2♀3)	Spawning	HOMCL(G2♀3)♂♂ (n=30, from 50-MT1)	HOMCL(G2♀3)♀♀ (n=10, from 50-1)	1993.4.27	1	63-1
64 HOMCL(G2♀3)	Crossing	HOMCL(G2♀3)♂1(from 50-MT1)	HOMCL(G2♀3)♀1(from 50-1)	1993.4.30	1	64-1
65 HOMCL(G2♀3)	Crossing	HOMCL(G2♀3)♂1(from 50-MT1)	HOMCL(G2♀3)♀2(from 50-1)	1993.4.30	1	65-1
66 HETCL(♀3•♂1)	Crossing	HOMCL(G2♀1)♂2(from 48-MT1)	ditto	1993.4.30	2	66-1, 66-2
67 HETCL(♀3•♂2)	Crossing	HOMCL(G2♀2)♂2(from 49-MT1)	ditto	1993.4.30	2	67-1, 67-2

間中を通じて集卵を継続し、毎日1回、午前9時頃に卵を回収した。得られた卵を浮上卵と沈下卵に分け、計量するとともに、前者を引続き培養し、その発生成績を求めた。

3. 染色体操作

雌性発生2倍体の作出には、精子の遺伝的不活化と卵核染色体の倍化を組合せる必要がある。このうち後者には第2極体の放出阻止と第1卵割阻止による二つの方法があり、それぞれ第2極体放出阻止型雌性発生2倍体および第1卵割阻止型雌性発生2倍体が作出される。

精子の遺伝的不活化は、小野里・山羽(1983)の希釈精液への紫外線照射による方法を採用した。紫外線照射に先立って、搾出した精液を *Pleuronectes platessa* のリングル液(水上, 1979)によって50倍または100倍に希釈した。希釈精液を径90mmガラスシャーレ1枚あたり0.5~2.0mlずつ入れ、薄く延し、室温中で、紫外線を照射した。紫外線は、照射面より30cm上方に位置する殺菌灯(GL15, 東芝製)2基を線源とし、76 ergs/mm²・secの強度で、1分間照射(4560 ergs/mm²)した。照射精液の作製に、1988年以前の作出例ではヒラメの精液を用いたが、1989年以降ではマダイの精液を用いた。

第2極体の放出阻止は、媒精2分後に開始する卵の冷却処理または加圧処理によって行なった(山本ら, 1987; 山本・増谷, 1988)。いずれの方法でも、処理開始まで、卵を常温(13.5~16.2℃)で培養した。冷却処理では、卵をメッシュネットに入れ、45分間、0℃の海水に浸漬した。処理終了後、直ちに卵を常温に戻した。加圧処理にはフレンチプレス(大岳製作所製)を用いた。卵を海水とともにセルに収容し、600 kg/cm²の加圧を6分間継続した。加圧終了後、緩やかに減圧し、卵を通常の培養管理下に戻した。1987年以前の作出例では冷却処理を採用し、1988年以降では加圧処理を採用した。

第1卵割の阻止は、媒精60分後に開始する加圧処理によって行なった(田畑・五利江, 1988b; 田畑, 1991)。卵を処理開始まで17℃で培養した。フレンチプレスを用いて、600 kg/cm²の加圧を6分間継続した。

4. 飼育方法

卵の発生成理は、浮上卵を1~2t水槽内に設置したゴース製ネットに収容して行ない、常温(12.5~18.3℃)の流水で培養した。

仔魚の飼育は、原則として、ふ化前日の胚形成卵を飼育水1ℓあたり10~30個収容して開始した。飼育水槽として、30ℓから1.6tの容量の水槽を用いた。飼育密度の高い飼育例では、日齢20前後に、飼育水1ℓあたり5~10個体に密度の調節を行なった。飼育水は、日齢9までが無換水で、その後仔魚の変態期まで毎日1回1/5~1/1量の換水を行なった。常温(13.7~20.2℃)による飼育を原則とし、水温の保持を常温海水によるウォーターバスで行ない、一部補助的にヒーターを使用した。餌料として、シオミズツボムシ(日齢2以降)およびアルテミアノープリウス(日齢20前後以降)を与えた。

稚魚の飼育は、原則として、日齢 30 ないし 40 の変態期末期の仔魚を計数のうえ、飼育水槽に再収容し、飼育群を設定して開始した。飼育水槽として、30 ℓ から 1.6 t の容量の水槽を用いた。稚魚の成長に合わせて、飼育水槽の大型化またはランダムな間引きによる飼育数の調節を行なった。変態完了以後は毎時 0.5~3.0 回転の流水飼育とした。通常は夏期に向って上昇しつつある常温条件下で飼育したが、恒温飼育実験群ではアクアトロンまたはヒーターとサーモスタットによって飼育水温の維持を行なった。餌料として配合飼料を飽食量与え、初期の餌付け期にはアルテミアノープリウスも給餌した。

日齢 90 ないし 150 以降の若魚および成熟魚の飼育には、500 ℓ から 5 t の容量の水槽を用いた。毎時 1.0~3.0 回転の常温流水飼育を行なった。餌料として、冷凍のイカナゴまたはマアジを与えた。週 3 回以上の給餌を行ない、とくに成長比較実験においては飽食量の給餌につとめた。

なお、常温飼育水の月別平均温度は、1~12 月それぞれ、12.3, 11.2, 11.8, 13.7, 16.5, 19.8, 23.1, 25.0, 24.7, 22.0, 18.2 および 15.1 °C であった。

5. 性ステロイド処理方法

本研究では、遺伝的雌の雄への性分化の転換を阻止する目的（第 2 章）および性ステロイドの性分化への影響を調査する目的（第 3 章）で、性分化時期における種々の方法による性ステロイド処理を行なった。使用した性ステロイドは、雌性ホルモンであるエストラジオール-17 β (E₂ と略記) と雄性ホルモンである 17 α -メチルテストステロン (MT と略記) で、それぞれ溶液への浸漬による投与および飼料を介した経口投与による処理を行なった。

浸漬処理は、1 日 1 回、飼育水に所定濃度の性ステロイドをエチルアルコールを介して溶入し、2 時間止水状態を維持して行なった。その際、飼育水中のエチルアルコール濃度が 5 ppm (5 μ ℓ/ℓ) となるように調節した。経口処理は、所定濃度の性ステロイドを含有する配合飼料を常法 (山崎, 1981) により作製し、これを給餌して行なった。

6. 性比調査方法

本研究では、種々の飼育群の性比調査を行なった。原則として、調査群を日齢 150 ないし 253 まで育成し、飼育魚のすべてまたはランダムに選び出した一部の個体について、開腹の上、生殖腺の形状によって性の判定を行なった。全長 160 mm 以下の小型個体については、生殖腺の組織標本の観察結果を性の判定に加味した。また、一部の調査群では、このようなサンプリングによる性判定によらず、調査群を満 1 歳ないし満 2 歳の成熟期まで育成し、精液または卵の搾出と、生殖口の雌雄差 (中本・小野山, 1985) に基づいて、性を判定した。

7. 組織学的観察

組織の固定にはブアン氏液を用いた。常法により、5～10 μm の厚さのパラフィン切片を作製し、デラフィールド・ヘマトキシリン-エオシンの二重染色を施し、光顕観察を行なった。

8. アイソザイム分析

凍結肝臓をアイソザイム分析試料とした。生魚について分析を行なう場合は、臓器生検針を用いて肝臓組織の一部を採出し（田畑・五利江, 1987；田畑, 1991）、試料とした。電気泳動では、肝臓の解凍ドリップを粗酵素液とした。アイソザイムの検出は水平式デンブengel電気泳動法によった。電気泳動緩衝液はトリスクエン酸緩衝液を用いた。検出した酵素はイソクエン酸脱水素酵素（IDH）で、染色法は谷口・岡田（1980）の方法に従った。

9. 組織移植方法

Han *et al.* (1991)の方法に従い、鰓蓋片を体側の皮膚下に移植し、拒絶反応の有無を判定した。すなわち、組織提供魚（ドナー）の鰓蓋部を切り取り、リンゲル液中で皮膚組織を伴った主鰓蓋骨および下鰓蓋骨を長方形に（5×10 mm）切り分け、移植片とした。被移植魚（ホスト）の有眼側の側線上方の皮膚に側線と垂直方向にメスで切り目を入れ、さらにその前後の真皮と皮下組織の間にメスを差し入れて間隙を作り、そこに移植片を挿入した。移植後、ホストを抗菌剤（ニフルスチレン酸ナトリウム）で処理し、細菌の感染を防いだ。移植2日後、移植片の皮膚の観察が可能となるように、移植部分のホストの皮膚を切り広げた。移植操作は飼育水温 20 $^{\circ}\text{C}$ 以下で行なった。移植後、ホストを通常の方法で飼育し、目視による移植部分の皮膚の観察と、触感による移植片の骨の硬度の確認を3カ月間以上継続した。

10. DNAフィンガープリント

原ら（1993）の方法に従い、放射性物質を用いない cold 法（出羽ら, 1991）によってDNAフィンガープリントの作製を行った。すなわち、ヒラメの血液からゲノムDNAを抽出し、制限酵素 *Hae* IIIでDNAを切断した。DNA断片を 1.3 %アガロースゲル電気泳動により分離し、メンブランフィルターにプロットした。Myoプローブをベルオキシターゼで標識したのち、標識プローブをメンブランフィルター上のDNAにハイブリダイズさせた。標識プローブのミノール反応により高感度フィルムに感光させ、DNAフィンガープリントを得た。

結 果

第1章 ヒラメの性分化過程

ヒラメの性統御を検討するうえでの基礎資料を得る目的で、ヒラメの性分化過程について日齢（ふ化後日数）ごとに組織学的に観察し、性分化時期について明らかにした。材料として、主に、通常ヒラメの作出群2N（N♀1）の通常の飼育群（2-1）から定期的に採集した標本を用いた。なお、雌および雄への分化の初期的段階においては、それぞれほぼ全雌および全雄となった性ステロイド未処理の飼育群である38-RT1（第2極体放出阻止型雌性発生2倍体、性分化時期の20.0℃恒水温飼育群）および38-RT2（同じく27.5℃恒水温飼育群）から得られた標本に基づいて記載を行なった。

1. 性的未分化期

全長4.4 mm、日齢10の仔魚（2-1）ですでに中腎輸管と消化管の間に1個の始原生殖細胞が観察された。細胞は8 μm \times 5 μm で、核は5 μm \times 4 μm の大きさであった（Pl. I-1）。

全長7.1 mm、日齢20の仔魚（2-1）では、中腎輸管の下方に前後約50 μm ほどの長さの1対の生殖隆起が形成され、厚さの薄い体細胞に覆われた数個の生殖原細胞が認められた。生殖原細胞は8~12 μm の楕円形で、核は径6~9 μm であった（Pl. I-2, 3）。

全長12.8 mm、日齢30の変態期末期の仔魚（2-1）では、初期生殖腺は腹腔の後部に位置し、腹腔背壁から垂下した。腹腔背壁に接する基底部分は約70 μm ほどの長さで、下方に30 μm ないし50 μm に伸張した像が観察された。生殖原細胞は、1個の仁が観察され、8~15 μm の大きさで、核は径6~9 μm であった（Pl. I-4）。

全長15.8 mm、日齢40の変態後の着底稚魚（2-1）では、生殖腺は細長く、腹腔背壁のほぼ後端から約190 μm の長さで垂下していた。生殖腺が腹腔背壁に接する基底部の幅は約80 μm ほどであった。生殖細胞に変化はみられなかった（Pl. II-5）。

全長19.2 mm、日齢50の稚魚（2-1）では、腹腔背壁後端から垂下する生殖腺はさらに細長くなり、太さは20 μm \times 15 μm で、長さ約300 μm に伸張した（Pl. II-6）。同じく日齢50で全長23.3 mmの稚魚（38-RT1）でも、生殖腺の状況はほぼ同様であり、生殖細胞はむしろまばらに散在し、一方、体細胞性要素の発達がみられた。生殖原細胞には変化はみられなかった（Pl. II-7, 8）。

このような観察結果から、全長23 mm以前のヒラメの仔稚魚は形態的に性的未分化期にあることが明らかとなった。生殖腺は、仔魚段階で生殖隆起の状態にあり、変態による稚魚期への移行にともなって腹腔背壁後端から細長く垂下するようになるが、形態的分化に乏しく、性的2型が認められないことが確認された。

2. 卵巢の分化過程

全長 27.5 mm, 日齡 60 の稚魚 (38-RT1) では, 生殖腺の形状に著しい変化がみられた。すなわち, 体細胞性要素が非常に発達し, 生殖腺は $120\ \mu\text{m} \times 240\ \mu\text{m}$ 程度の大きさのピラミッド型をした塊状となり, 膀胱の上側面に位置した。一方, 生殖原細胞はまばらで, 大きさは $12\sim 15\ \mu\text{m}$, 核は径 $8\sim 9\ \mu\text{m}$ であり, 未分化期の生殖腺における生殖原細胞の状況と相違しなかった (Pl. III-9, 10)。

全長 39.5 mm, 日齡 70 の稚魚 (38-RT1) では, 生殖腺は長径 $300\ \mu\text{m}$ 程の大きさで, 卵巢腔に発達すると考えられる内腔が認められた。この内腔は生殖腺の後部から前方外側に向けて形成され, 前部では生殖腺の体細胞性要素の突起に隔てられた間隙として認められた。しかし, 生殖原細胞は未だ未分化期と同様な形態を示した (Pl. III-11, 12)。

全長 69.5 mm, 日齡 80 の稚魚 (38-RT1) では, 生殖腺は卵巢としての特徴をよく備えた。卵巢は腹腔の後端に位置し, 長径 $800\ \mu\text{m}$ 程の大きさで, 大きな卵巢腔がほぼその全長に渡って存在した。卵巢腔の周囲には卵原細胞が線維性の間質に囲まれて分布し, 卵巢薄板に発達すると考えられるひだ状構造を形成した。卵原細胞は包囊形態を示しつつあり, 一部で減数分裂の開始を示唆する細胞の小型化が認められた (Pl. IV-13, 14)。

全長 94.5 mm, 日齡 90 の個体 (38-RT1) では, 卵巢内に多くの包囊が認められ, 中には減数分裂の開始が確認される卵母細胞が多数観察された。卵巢は長径約 $1400\ \mu\text{m}$ で, 大きくひだ状に分枝した卵巢腔が前部上方から後部下方にかけて広がった。卵巢腔を囲んで卵巢薄板が発達し, その表層に卵母細胞包囊が位置した。包囊内では種々に変化する卵母細胞の核の状況が観察され, 核径は $3\sim 4\ \mu\text{m}$ まで小型化した。また, 卵巢薄板中には, 核径 $7\sim 8\ \mu\text{m}$ の減数分裂の開始以前の卵原細胞もかなり存在した (Pl. IV-15, 16)。

全長 127 mm, 日齡 120 の個体 (2-1) では, 卵巢内に染色仁期の卵母細胞がみられるようになった。この染色仁期の卵母細胞は径 $20\ \mu\text{m}$ 以下で, 核径は $12\ \mu\text{m}$ 以下であった。卵巢は長径約 $2,300\ \mu\text{m}$ で, 卵巢薄板が複雑に入組んで発達した (Pl. V-17, 18)。全長 146 mm, 日齡 141 の個体 (2-1) でも, およそ同様な卵母細胞の発達段階が観察された。しかし, 卵巢には後方突起の発達がみられ, 卵巢は約 7 mm の長さに達した (Pl. V-19)。

全長 227 mm, 日齡 184 の個体 (2-1) では, 周辺仁期に進んだ卵母細胞が多くみられるようになった。卵巢は後方突起が伸張し, 長さ約 15 mm に達した。周辺仁期の卵母細胞は最大径 $50\ \mu\text{m}$ 程度で, 核内に数個の仁がみられた (Pl. V-20)。

以上の観察結果から, 生殖腺の卵巢への分化は, 卵原細胞から卵母細胞への移行にさきだち, 体細胞性要素による形態形成によって特徴づけられることが明らかとなった。すなわち, 生殖腺は, 全長 27 mm ですでに形態的变化を示し, さらに全長 39 mm で将来卵巢腔に発達する内腔の出現によって卵巢への分化が確認された。卵原細胞から卵母細胞への移行は, 全長 69 mm で兆候が現れ, 全長 94 mm で活発となり, 雌への性分化が完了した。

3. 精巣の分化過程

全長 27.3 mm, 日齢 46 の稚魚 (38-RT 2) では, 生殖腺は未だ未分化期と同様な形状を示した。生殖腺は腹腔背壁後端から細長く垂下し, 太さは $40\ \mu\text{m} \times 30\ \mu\text{m}$ で, 長さ約 $700\ \mu\text{m}$ に伸張した。生殖原細胞はかなり密に分布し, 径 $10\sim 18\ \mu\text{m}$ の楕円形で, 核は径 $8\sim 10\ \mu\text{m}$ であった (Pl. VI-21, 22)。

全長 37.0 mm, 日齢 56 の稚魚 (38-RT 2) では, 生殖腺は精巣への分化に向けた特徴的な形態を示した。すなわち, 生殖腺は長さ約 $550\ \mu\text{m}$, 太さ約 $120\ \mu\text{m}$ の先端のとがった棒状形で, 腹腔の後端において膀胱の上側面に先端を上前方に向けて位置した。生殖原細胞は生殖腺の背縁側に沿って集中して位置し, 一方, 生殖腺の腹縁側には楕円形の核を特徴とする細長い体細胞が存在した。生殖原細胞は未だ未分化期と同様な形態を示した (Pl. VI-23, 24)。

全長 67.0 mm, 日齢 66 の稚魚 (38-RT 2) では, 生殖腺の上背縁側に約 $800\ \mu\text{m}$ の幅で生殖原細胞が集中して分布し, その下方には楕円形の核を特徴とする細長い体細胞が同方向に並んで位置した。後者は, より大型魚の観察結果から, 輸精管の形成に関与することが判った。生殖原細胞は盛んな増殖がうかがわれ, 径 $12\sim 20\ \mu\text{m}$ の楕円形で, 核は $8\sim 12\ \mu\text{m}$ であった (Pl. VII-25, 26)。

全長 94.0 mm, 日齢 78 の個体 (38-RT 2) では, 生殖腺および輸精管の前駆域は両者で一続きのきわめて細長い形態を呈した。これは, 腎臓後端よりやや後方で腹腔壁に接して始まり, 膀胱の外側に沿って排泄口の方向に延びて位置した。このうち, 生殖細胞は腹腔壁に接する長さ $1,200\ \mu\text{m}$ の上部に限って分布し, この区域の皮層部が精巣に発達することが示唆された。精原細胞は数を増し, 数個ないし数十個ずつが体細胞とともに小群を形成するのが観察された。これは初期的な精小葉構造と考えられ, その中の精原細胞は静止期と同様に径 $12\sim 18\ \mu\text{m}$ で核径 $8\sim 12\ \mu\text{m}$ の大型の細胞に加え, 径 $10\ \mu\text{m}$ で核径 $5\ \mu\text{m}$ 程度に小型化した細胞が増加した (Pl. VII-27, 28)。

全長 129 mm, 日齢 120 の個体 (2-1) では, 精巣は輸精管の前駆域の上方に位置し, 長さ $1,800\ \mu\text{m}$, 最大幅 $800\ \mu\text{m}$ の長三角形を呈した。生殖細胞のほとんどは未だ精原細胞であったが, 精小葉構造がより明瞭となった。一部の精小葉では包囊が形成され, 精母細胞への移行が認められた (Pl. VIII-29, 30)。

全長 148 mm, 日齢 141 の個体 (2-1) では, 精巣は長径約 $4\ \text{mm}$ の長球形を示した。包囊内では減数分裂にともなう種々の段階の精母細胞の核変化が観察された。一部ではすでに精子の完成がみられた。しかし, 精原細胞も未だ多数存在した (Pl. VIII-31)。

全長 228 mm, 日齢 184 の個体 (2-1) では, 精巣は長径約 $6\ \text{mm}$ に大型化した。精巣内ではきわめて活発な精子形成が観察された。精巣の周縁部には精原細胞のみからなる精小葉が分布したが, 内側の大部分の精小葉はすでに精子で満たされた精小葉内腔を形成していた。とくに精巣の深部では, 生殖細胞を失った多くの精小葉が多腔状の輸精洞を構築するのが観察された (Pl. VIII-32)。

以上の観察結果から, 生殖腺の精巣への分化は, 精原細胞から精母細胞への移行にさきだち,

体細胞性要素を主とした形態変化によって、卵巢への分化過程と明確に区別されることが判明した。すなわち、生殖腺の精巢への形態的变化は、全長 37 mmで始り、以後、生殖細胞の分布位置と将来輸精管を形成する体細胞の発達状況において特徴づけられた。また、全長 94 mmで精小葉構造が出現した。さらに、全長 129 mmで精原細胞から精母細胞への移行が認められ、雄への性分化が完了した。分化した精巢では、精子形成が短期間に進行した。

4. 考 察

田中(1987)は、ヒラメの性分化過程を観察し、とくに生殖腺の卵巢への分化を詳細に記載した。その中では、全長 30 mm前後で卵巢腔の形成により卵巢の分化が確認され、全長 55 mm前後で卵巢における卵母細胞包囊の出現がみられるが、精巢では精母細胞の出現は遅れ、全長 100 mmを越えてからであることが示されている。本研究では、これらの点でおよそ同様の結果が得られたが、さらに全雄に分化した群を調べることによって、精巢への分化過程をより詳しく観察することができ、卵巢と精巢の分化を初期的段階より比較することができた。すなわち、仔魚および変態着底直後の稚魚は形態的に性的未分化期にあるが、将来の卵巢および精巢はそれぞれ全長 27 mmおよび 37 mm時点ですでに互に区別できる形態的特徴を示した。その後、生殖細胞の減数分裂開始に至るまで、卵巢においては卵巢腔の出現、そして精巢においては生殖細胞の分布様式と特異な体細胞の発達状況において、それぞれの特徴は明らかであった。このことから、ヒラメの性分化は、生殖細胞の減数分裂による母細胞への移行にさきだって、体細胞性要素による形態形成の性的相違を指標として、より早期に開始が認められることが分った。第3章で述べるように、性分化に影響を及ぼす飼育水温や性ステロイドの感受期は全長 40 mm以前の時期に存在し、全長 40 mmの時点で性分化の方向性が確定しているものと思われる。それゆえ、卵巢および精巢それぞれで生殖細胞の減数分裂が開始される時期よりかなり早い期間が、ヒラメの性分化においては重要な意義を有すると考えられる。

第2章 遺伝的性決定とその人為的統御

ヒラメの遺伝的性決定機構を明らかにし、遺伝的性の人為的統御方法を検討する目的で、ヒラメの種々の作出群について性比調査を行なった。これは雌性発生2倍体やその後代等の、夏季に向って上昇しつつある自然水温条件下ではほぼ同様な方法で飼育された群を対象とした。性比調査は、ホルモン未処理の通常の飼育群とともに、性転換阻止レベルの雌性ホルモン処理を施した飼育群についても行なった。この性転換阻止レベルのホルモン処理は、性分化時期におけるエストラジオール-17 β (以下E₂と略記)の10 ppb (10 μ g/ ℓ 飼育水)の濃度での浸漬処理または0.3 ppm (0.3 μ g/g 飼料)の濃度での経口投与で、第3章で述べるように、性分化の転換の影響を排除し、本来の遺伝的性比を知るために有効な方法である。得られた結果から、ヒラメの性を決定する遺伝子型について考察し、遺伝的全雌群の作出方法を示した。

1. 雌性発生2倍体の性比

雌性発生の誘起によって生じる性比の変化を明らかにし、ヒラメの性を決定する遺伝子型についての資料を得る目的で、第2極体放出阻止型雌性発生2倍体および第1卵割阻止型雌性発生2倍体の性比を調査した。

1) 第2極体放出阻止型雌性発生2倍体の性比

第2極体放出阻止型雌性発生2倍体の作出群8例について、ホルモン未処理の合計11の飼育群と、性転換阻止レベルのE₂処理を施した合計10の飼育群について性比を調べた。これらと共通の雌親魚に通常雄を交配した対照群についても、ホルモン未処理の合計7の飼育群と、E₂処理を施した合計7の飼育群の性比を調べた。

各飼育群の性比をTable 2に示した。

第2極体放出阻止型雌性発生2倍体のホルモン未処理群では、雌の割合は群によって43.8%から93.0%の範囲で変動し、雌雄比1:1と有意差のない群から雌の割合が著しく高い群まで認められた。作出群によって性比が相違するばかりでなく、飼育群3-1から3-4のように、同一作出姉妹群内で、飼育群の相違によって、雌の割合が55.3%から84.0%まで変動した例も存在した。一方、E₂処理を施した飼育群では、雌の割合の著しい増加が認められた。すなわち、10群中7群で雌100%となり、雄が出現した3群でもその割合は7.4%以下に限られた。

対照の通常ヒラメでは、ホルモン未処理群で、雌の割合は35.7%から63.4%であり、雌雄比1:1と有意差のない性比がみられた。さらに、E₂処理を施したいずれの飼育群でも、約半数の雄が出現し、雌の割合は68.4%以下にとどまり、雌雄比1:1から有意に雌の割合が増加することはなかった。対照の通常ヒラメはこの点で第2極体放出阻止型雌性発生2倍体の状況と明らかに異なった。