

第4章 雌性化種苗の大量生産方法と成長特性

ヒラメの成長は雌が雄を上回り、雌性化種苗は養殖用としてきわめて経済性が高いものと期待される。そこで、第2章および第3章で得られたヒラメの性統御法を基に、ヒラメの繁殖特性に適合した雌性化種苗の大量生産方法を検討した。すなわち、ヒラメの生殖周期について調査を行なうとともに、親魚の自然産卵を利用した効率的な雌性化種苗の作出方法を検討した。さらに、クローン魚を用いて雌雄の成長差を確認するとともに、準量産規模で作出された雌性化種苗の飼育実験を行ない、その養殖における有利性を実証した。

1. ヒラメの生殖および産卵周期

ヒラメは、毎年春先から初夏にかけて産卵し、成熟に明確な年周期があることが知られている。また、1回の産卵期には、同一の雌親魚が多回産卵し、産卵数も著しく多いことが報告されている(高橋ら, 1980; 大塚ら, 1980; 平本ら, 1981)。しかし、これらの知見は複数の雌雄親魚からなる産卵群の種苗生産過程での採卵結果から推定されているのみで、より基本的な生殖腺の発達過程や雌個体別の産卵周期についてはほとんど調べられていない。そこで、ヒラメの卵巣および精巣の発達過程を組織学的に検討し、ヒラメの生殖周期について知見を収集した。さらに、雌個体別の産卵実験を行ない、ヒラメの産卵周期について調査した。

1) 生殖周期

ヒラメの雌雄の生殖周期について知見を得る目的で、通常ヒラメの雌雄の生殖腺の1年半に渡る季節変化を調べた。すなわち、鳥取県栽培漁業センターで種苗生産された通常ヒラメ(1987年3月下旬ふ化)を育成し、1988年1月から1989年6月まで、各月雌雄計約10個体を採集した。魚体および生殖腺の重量を測定するとともに、生殖腺を組織学的に観察した。

(a) 雌の生殖周期

雌のGSI(生殖腺体指数:生殖腺重量/体重)の周年変化をFig.3に示した。雌のGSIは、0歳および1歳の2月(1989年)までは3%以下の低い値で推移した。その後、3月から急激な増加傾向をみせ、満2歳の4月には周年で最も高い10%前後の値を示した。5月でも8%前後の比較的高い値で推移したが、6月には2%以下の低い値を示した。なお、4、5月のGSIの高い値で推移する時期にそれより低い値を示す個体も認められたが、6月の標本はいずれも5月における成熟(排卵)を確認した個体である。

本研究では、卵形成過程を形態的な特徴に基づいて次に記載する7期に分けた。各期の区分は、Yamamoto(1956)のクロガレイ(*Liopsetta obscura*)の卵巣卵についての区分に準じて行なった。

1. 染色仁期 (Pl. IX-33) : この期の卵母細胞は、直径が 20 μm 以下で、薄い細胞質に囲まれた比較的大きな核を中央に有している。核内には、染色糸が複雑に入組み、大型の染色仁が1個存在する。
2. 周辺仁期 (Pl. IX-34) : この期の卵母細胞は、直径が 20~60 μm で、比較的大きな円形の核を有する。肥厚した細胞質はヘマトキシリンに濃染する。核内には、染色糸が散在し、核膜に沿って多数の仁が不規則に分布している。また、卵母細胞を囲む薄い濾胞層が認められる。
3. 油球期 (Pl. IX-35~38) : この時期に該当する卵母細胞は、初期では直径約 60 μm 、後期では直径約 200 μm とその大きさを増す。油球は、通常の組織切片では空胞状の構造として観察されるが、ホルマリン固定凍結切片のズダンブラック B による脂質染色で確認された。これは、初め細胞質中に散在して出現し (Pl. IX-35)、徐々にその数を増加させる (Pl. IX-36)。さらに、これらは求心的に移動し、核の周辺に集合する。その頃、濾胞層が厚く明瞭に認められる。また、空胞状の小胞として観察される卵黄胞が卵膜に沿って出現する (Pl. IX-37)。卵黄胞はその数を増加させながら求心的に移動し、最終的には細胞質全体に一樣に広がる (Pl. IX-38)。しかし、このように卵黄胞を持つ卵母細胞は比較的数が少なかった。
4. 第一次卵黄球期 (Pl. IX-39) : この期の卵母細胞はさらに大きくなり、直径 200~250 μm に達する。求心的に移動する卵黄胞の間に、エオシン陽性の卵黄顆粒が出現する。卵黄顆粒は、初め細胞質の周縁部に存在するが、卵母細胞の成長につれて数と大きさを増しながら求心的に広がる。また、濾胞層の内側に薄い卵膜も認められるようになる。
5. 第二次卵黄球期 (Pl. IX-40) : 卵径は増大し、250~300 μm 程度となる。細胞質はさらに大きく明瞭となった卵黄顆粒で満たされている。濾胞層および卵膜はともに明瞭に認められる。
6. 第三次卵黄球期 (Pl. IX-41) : 核の周辺に集合している油球は大きさを増し、核表面に食い込む。卵黄球はさらに大きさを増す。この時期になると卵母細胞は直径 400~450 μm に達する。また、卵膜は、10 μm 程度の厚さとなり、より明瞭に認められる。
7. 核移動期 (Pl. IX-42~44) : 卵母細胞の大きさは、この時期までに、最大径の 450~500 μm に達する。核が動物極側に移動を開始する (Pl. IX-42)。この時期の卵母細胞ではしばしば卵門が認められ、移動する前の核と卵門の間の細胞質では、卵黄顆粒が退き、ヘマトキシリン陽性の部位が現れる (Pl. IX-43)。また、この時期には卵黄顆粒および油球の癒合が始り、これは植物極側から進行する。核は移動後消失し、卵母細胞は、卵黄顆粒および油球の癒合した成熟卵となる (Pl. IX-44)。

このような卵形成過程の7期の発達段階をもとにして、周年に渡る卵巣卵組成の変化を調べた。すなわち、各月においてGSIの一番高い標本について、切片標本から、それぞれ約1,000個の卵母細胞を卵形成過程の各期に分け、それらの割合を求めた (Fig. 4)。

染色仁期、周辺仁期および油球期の卵母細胞は、周年卵巣内に認められた。1歳の9月までは染色仁期と周辺仁期の卵母細胞が卵巣内の大部分を占めたが、10月から1月にかけて周辺

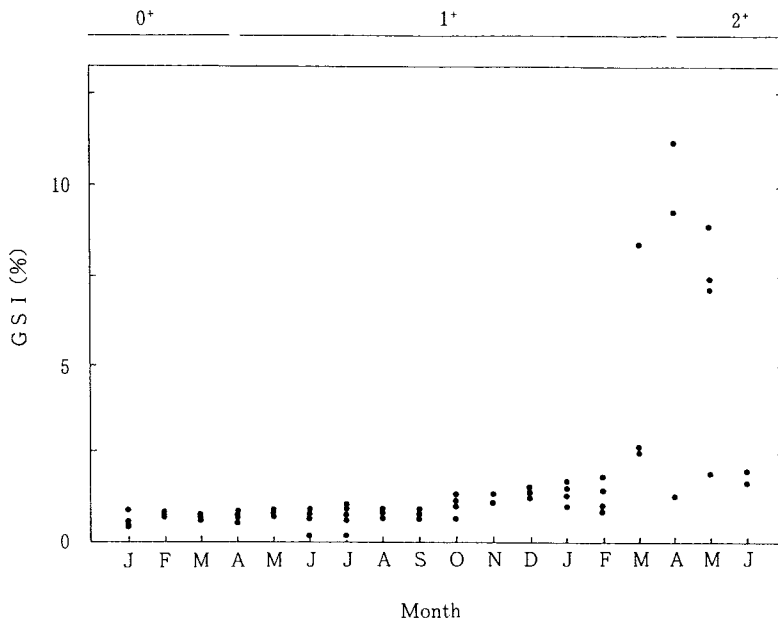


Fig.3. Monthly change in gonad somatic index (GSI) of females.

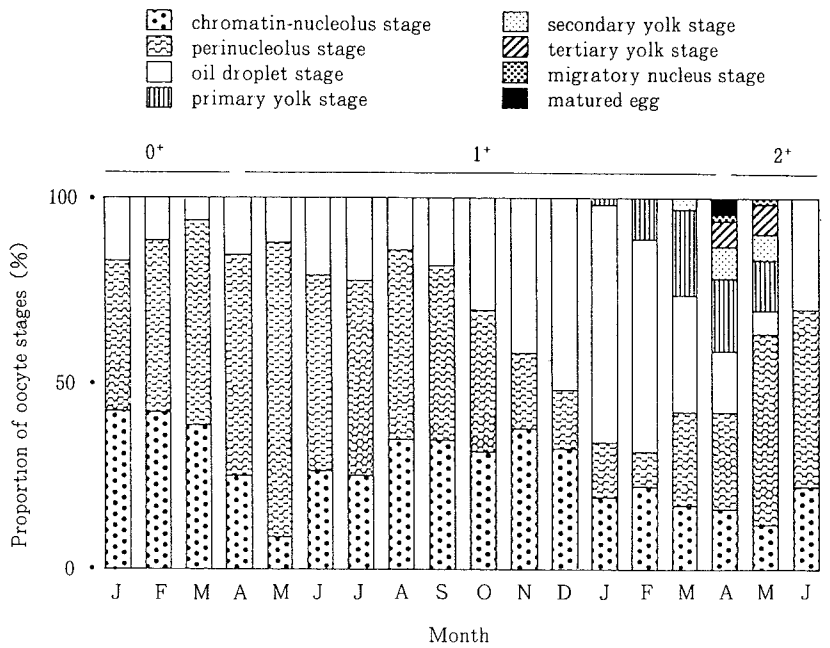


Fig.4. Monthly change in proportion of oocyte stages in oogenesis.

仁期の卵母細胞が 38.2 %から 14.1 %に減少し、油球期の卵母細胞が 30.2 %から 64.8 %に増加した。1月の個体ではすでに第一次卵黄球期の卵母細胞が 1.6 %出現し、2、3月にその割合を増加させていった。満2歳の産卵期である4月には、染色仁期から核移動期までのすべての発達段階の卵母細胞および成熟卵が認められた。5月にも成熟卵以外の各発達段階の卵母細胞が認められたが、周辺仁期の卵母細胞が、4月で 25.7 %なのに対し、5月では 51.2 %に増加した。2歳の6月の経産個体の卵巣卵組成は、前年の1歳の6月とほぼ同じ組成を示した。

このように、調査したヒラメの雌には満2歳で初回成熟する個体が出現した。繁殖期では、その直前の1月から卵黄形成が開始され、急速に卵母細胞の発進が進んだ。雌の繁殖期にさきがけた卵形成の準備期間は非常に短かった。一方、4月および5月の繁殖盛期には、すべての発達段階の卵母細胞が同時に卵巣内に存在し、明瞭に認められる卵群の突出を欠いていた。

このことから、ヒラメの卵母細胞の発生様式は典型的な非同期発達型 (Wallace and Selman, 1981; de Vlaming, 1983; 高野, 1989) であることが確認された。

(b) 雄の生殖周期

雄の GSI の周年変化を Fig. 5 に示した。雄の GSI は、0歳の2、3月で大きくばらつきながらも増加傾向を示し、満1歳の5月で 1.0~1.5 %の高い値を示した。8月から10月までは 0.1 %程度の低い値で推移したが、11月以降にふたたび増加し、満2歳の4月の1個体は周年において最も高い 2.6 %の値を示した。

Grier (1981) の提唱した精巣の組織学的な型分けによれば、ヒラメの精巣は精原細胞非極在型である。精小葉内には、いくつかの胞嚢が存在し、それぞれの胞嚢には第二精原細胞、第一および第二精母細胞、精細胞、および精子が観察された。精原細胞には、分裂をせずに 2~3個の小群のまま存在している第一精原細胞も認められた。精小葉内腔に放出された精子も観察された (Pl. X-45~47)。

このような観察結果より、本研究では、周年に渡る成熟度の変化を調べる目的で、精子形成の過程を容易に判別しうる形態的特徴に基づいた次の4期に分けた。

1. 精原細胞期
2. 精母細胞期
3. 精細胞期
4. 精子期

精巣内におけるこの4期の発達段階の細胞の有無を周年に渡って調べ、Table 19 に示した。精原細胞は一年中存在した。精母細胞および精細胞は1歳の6月から9月までを除くすべての月に認められた。精子は1歳の9月および10月以外のすべての月に存在した。すなわち、0歳の1月ではすでにいずれの段階の細胞も存在した。その後、次第に精子形成が活発となり、とくに1歳の5月および6月には精巣の半分以上が精子で満たされるまでになった。一方、4月から6月の間、精原細胞は減少した。さらに、6月には精母細胞および精細胞が完全に消失

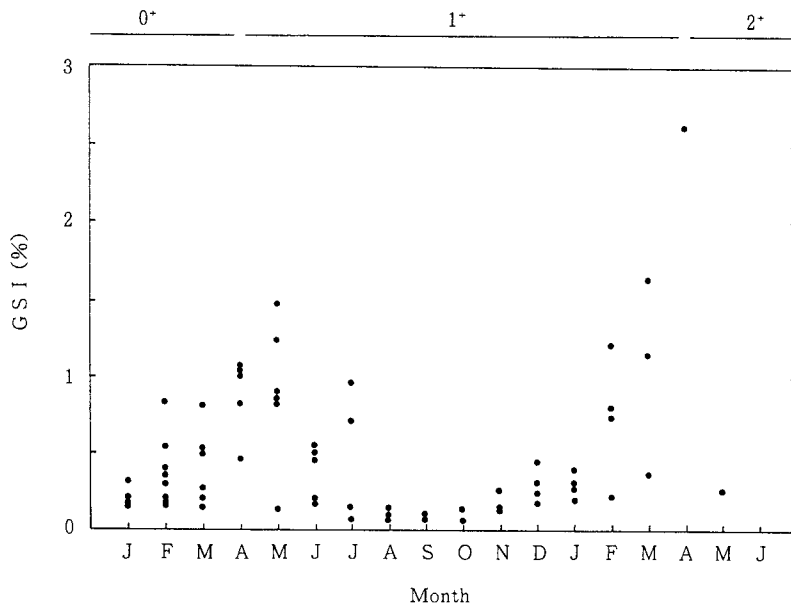


Fig.5. Monthly change in gonad somatic index (GSI) of males.

Table 19. Monthly change in spermatogenesis.

Age	0 ⁺					1 ⁺					2 ⁺						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5
Spermatogonium	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Spermatocyte	+	+	+	+	+						+	+	+	+	+	+	+
Spermatid	+	+	+	+	+						+	+	+	+	+	+	+
Sperm	+	+	+	+	+	+	+	+				+	+	+	+	+	+

した。次いで、精子は7月に激減し、8月にはわずかに認められる程度になった。この間、7月には精原細胞がふたたび数を増した。10月になるとわずかではあるが精母細胞と精細胞が現れ、11月には早くも精子が観察された。この後、満2歳の成熟においても満1歳時と同様な成熟過程がみられた。

このように、ヒラメの雄では、満1歳に初回成熟し、満2歳でも同様の成熟がみられた。3月から6月までの繁殖期のための精子形成はすでに前年の10月から開始され、繁殖期後期の5月頃まで、およそ8カ月間続くことが観察された。6月および7月にも比較的多量の精子が精巣内に認められ、この期間も機能的な成熟が維持されていると推定された。8月には、残留精子が少量存在するだけの精巣休止状態となったが、これは9月まで継続するに過ぎなかった。

2) 産卵周期

ヒラメの産卵周期について知見を得る目的で、ヒラメ雌親魚の個体毎の1産卵期を通じた産卵状況を調査した(平野・山本, 1992)。

雌個体別産卵群として、雌1個体と雄3個体を組合せて飼育する4群(A~D)を設定し、1991年3月1日から6月17日までの約4ヶ月間、それぞれ1.8 t水槽で飼育した。親魚は雌雄とも作出群2N(N♀1)に属する個体で、産卵実験の開始および終了時の魚体サイズをTable 20に示した。採卵を3月20日から6月17日まで行ない、産卵経過と卵の発生成績を記録した。

すべての雌親魚で、3月下旬(水温12.0℃)には産卵が開始され、その後6月中旬(18.8~19.8℃)に至るまでの約3ヶ月間に渡って産卵が継続した。産卵期間を通じて得られた卵数およびその発生成績を通算してTable 21に示した。B群とD群については、毎日の産卵数と卵の発生成績をFig.6およびFig.7に示した。

各雌個体とも3月下旬より6月中旬までの約3ヶ月間が産卵期であり、この間の産卵頻度(産卵日数/産卵期間中の日数)は個体によって66%から88%の範囲のかなり高い値を示した。産卵期間中に雌1個体の産出した卵数は個体により約800万粒から1,150万粒におよんだ。これを魚体重1kgあたりに換算すると約340万粒から400万粒となる。1日最大産卵数は個体によって約48万粒から66万粒であった。また、産卵数の日変化は大きく、一定の規則性は認め難かった。産卵期間を通じての卵の浮上率は個体によって16.2%から32.9%の範囲にあった。毎日連続した産卵が確認されている時期に浮上率が高い傾向にあった。胚形成率は個体毎に通算すると29.3%から53.1%の範囲にあったが、1日毎の胚形成率は大きく変化した。

このことから、ヒラメは非同期発達型の卵母細胞の発達様式に適合した多回産卵魚であり、マダイ(松浦ら, 1988)のようにほぼ毎日産卵する魚であることが確認された。ヒラメは、長期に渡る産卵期を持ち、その間に非常に多くの卵を産出することも確認された。

Table 20. Body size of parental hirame flounder at the beginning (1991 March 1) and end (1991 June 17) of the natural spawning experiment.

Spawning group	Sex	Number	Beginning		End	
			Body weight	Total length	Body weight	Total length
A	♂	3	g 1,020±127.5 ¹⁾	mm 465±13.0	g 1,167±114.7	mm 479±11.8
	♀	1	3,340	640	2,900	645
B	♂	3	1,007±18.9	456±2.6	1,093±47.1	460±4.5
	♀	1	3,120	650	2,920	650
C	♂	3	893±156.9	432±17.0	967±132.0	438±15.8
	♀	1	3,120	643	2,820	650
D	♂	3	893±126.8	440±17.0	953±68.0	449±16.5
	♀	1	2,560	565	2,380	570

1 : Average ± standard deviation

Table 21. Spawning period, number of eggs spawned and rate of survival at the embryonic stage in each group in the natural spawning experiment.

Spawning group	Spawning period	Number of days eggs spawned	Total number of eggs spawned	Number of ¹⁾ eggs spawned per 1 kg body weight	Proportion ²⁾ of eggs floated	Proportion ³⁾ of eggs with embryos developed
			×10 ³	×10 ³	%	%
A	3/22 ~ 6/8	62	10,030	3,459	16.2	29.3
B	3/22 ~ 6/12	53	11,579	3,993	23.5	49.9
C	3/29 ~ 6/16	53	10,166	3,631	17.6	30.7
D	3/23 ~ 6/10	61	8,180	3,408	32.9	53.1

1 : Total eggs/body weight of maternal fish (weight in June 17)

2 : Floated eggs/spawned eggs.

3 : Embryos developed eggs/floated eggs.

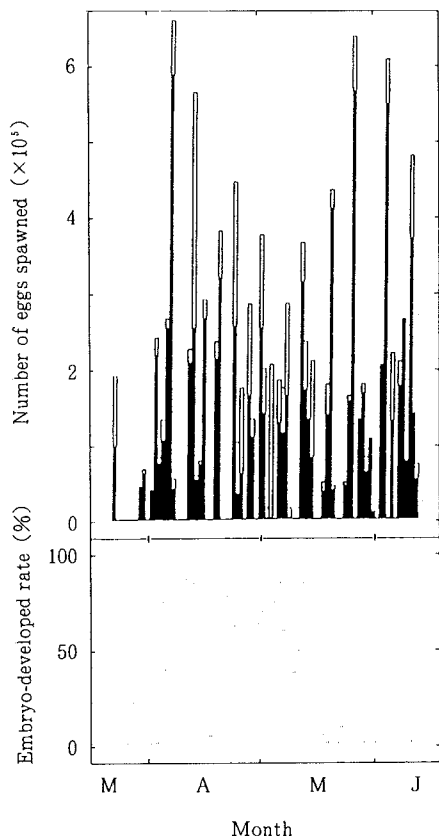


Fig. 6. Daily change in numbers of eggs spawned (above, open column, floated; solid column, sunken eggs) and embryo-developed rate (below, developing eggs / floated eggs) in spawning group B.

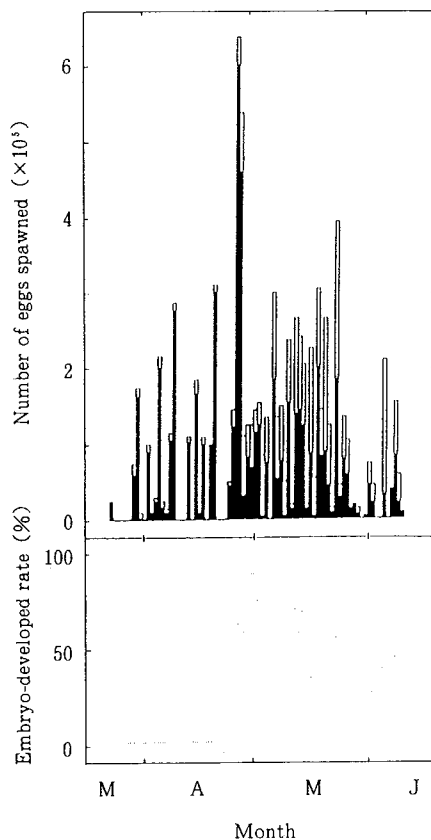


Fig. 7. Daily change in numbers of eggs spawned (above, open column, floated; solid column, sunken eggs) and embryo-developed rate (below, developing eggs / floated eggs) in spawning group D.

2. 自然産卵による雌性化種苗の生産方法

ヒラメの性決定には雄ヘテロ型 (XX-XY型) の遺伝子支配が存在し、ヒラメの雌性化種苗生産には、性転換雄 (XX雄) の通常発生後代の作出による遺伝的性の雌性への統御が有効な方法である (第2章)。また、ヒラメは非同期発達型の卵発達様式を持つ毎日産卵魚であることが判明し、このことはヒラメにおける搾出採卵および人工受精が効率的ではないことを意味する。そこで、雌性化種苗の大量生産方法の確立を目的に、性転換雄と通常雌を親魚とする自然産卵実験を行ない、全雌卵 (XX卵) の大量作出方法について検討した。さらに同様な産卵群によって産出された卵を用いた種苗生産を行ない、作出種苗の性比を調査し、雌性化種苗量産の実証を試みた。

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

性転換雄の産卵行動の正常性について調査し、性転換雄と通常雌の自然産卵による全雌卵の大量作出方法を検討する目的で、その自然産卵実験を行なった (山本・増谷, 1990)。

産卵群には、第2極体放出阻止型雌性発生2倍体雄と通常雌の組合せによる性転換雄群 (E) と、通常雌雄による対照群 (F) を設定し、1988年12月27日から1989年6月30日まで飼育した。親魚として、性転換雄には作出群3 G1 (N♀2) のホルモン未処理の飼育群に出現した雄を用い、通常雌雄には作出群2 N (N♀1) に属する個体を用いた。いずれの産卵群でも、雄15個体と雌5個体を組合せた。産卵実験の開始および終了時の魚体サイズをTable 22に示した。採卵を3月20日から6月30日まで行ない、産卵経過と卵の発生成績を記録した。

両産卵群とも、3月22日 (水温 12.6 °C) に同時に産卵開始が確認され、その後3カ月以上に渡って産卵が継続し、6月下旬 (19.8 °C) に終了した。両産卵群の毎日の産卵数と10日ごとに集計した卵の発生成績をFig. 8に示した。さらに、産卵期間を通じて得られた卵数およびその発生成績を通算してTable 23に示した。

性転換雄群では、産卵期の全般を通じて良質卵が安定して産出され、卵の発生成績も良好であった。累計放卵数は2,200万粒にのぼり、約990万粒の胚形成卵が得られた。全放卵数に対する胚形成卵の割合は45.0%の高率であった。この結果では、単純平均すると、1個体の雌から産卵期を通じて毎日約2万粒の胚形成卵が得られたことになる。

一方、対照群では、産卵は産卵期の全般を通じて順調であったが、放卵量およびその発生成績とも性転換雄群より劣った。とくに、卵の浮上率の差は大きく、全放卵数に対する胚形成卵の割合は27.3%で、性転換雄群の値の約2分の1に相当した。

このことから、性転換雄、すなわち第2極体放出阻止型雌性発生2倍体雄の放精行動は正常であり、これを用いた自然産卵による採卵は、遺伝的に雌に統御された卵 (XX卵) を大量に作出する方法として、容易で安定したものであることが確かめられた。

Table 22. Body size of parental hirame flounder at the beginning (1988 Dec.27) and end (1989 June 30) of the natural spawning experiment.

Spawning group	Parental cross	Sex	Number	TL or BW (Average \pm SD)		
					eginning	End
E	G1 ♂ \times N ♀	♂	15	TL(mm)	418 \pm 15.2	423 \pm 13.9
				BW(g)	815 \pm 100.6	799 \pm 84.0
		♀	5	TL	496 \pm 15.1	537 \pm 14.0
				BW	1424 \pm 75.0	2004 \pm 227.6
F	N ♂ \times N ♀	♂	15	TL	385 \pm 19.0	396 \pm 19.1
				BW	634 \pm 87.5	716 \pm 91.3
		♀	5	TL	511 \pm 18.8	537 \pm 18.8
				BW	1510 \pm 132.2	1778 \pm 229.7

Table 23. Totals and performance in embryonic development of hirame flounder eggs, obtained throughout the natural spawning experiment.

Spawning group	Parental cross	Total number of eggs spawned	Number of eggs floated	Proportion ¹⁾ of eggs floated	Number of eggs with embryos developed	Proportion ²⁾ of eggs with embryos developed
E	G1 ♂ \times N ♀	$\times 10^3$ 22,086	$\times 10^3$ 17,748	% 80.4	$\times 10^3$ 9,941	% 56.0
F	N ♂ \times N ♀	18,828	10,249	54.4	5,134	50.1

1 : Floated eggs/spawned eggs. 2 : Embryo-developed eggs/floated eggs

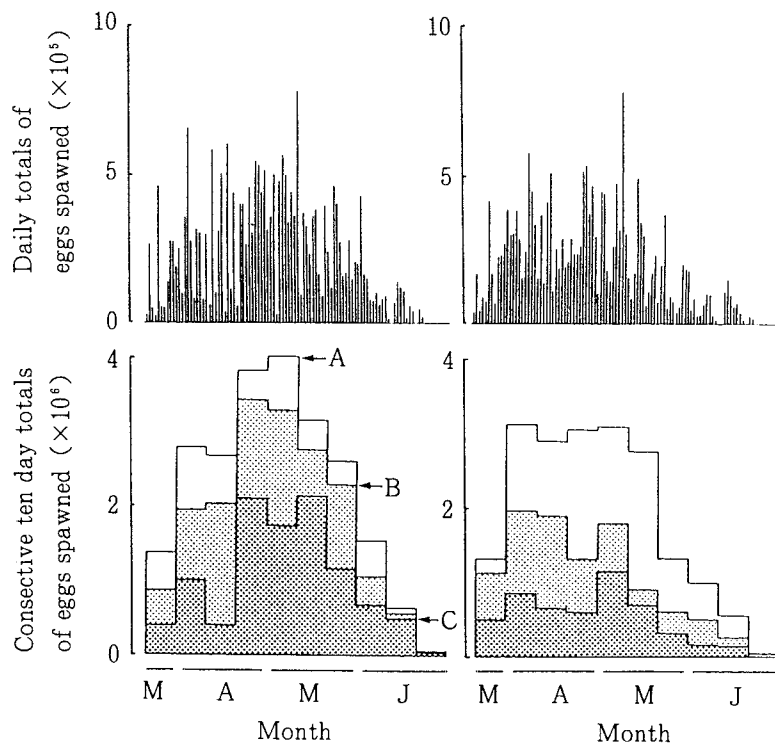


Fig.8. Daily (above) and consecutive ten day (below) totals of eggs spawned, the latter indicating embryonic development; in spawning group E of gynogenetic males with normal females (left) and spawning group F of normal males with normal females (right). A, total eggs spawned; B, number of eggs floated; C, number of eggs with developed embryos.

2) 産出卵による種苗生産

雌性化種苗の実際の大量生産の可能性を実証する目的で、準量産規模による生産実験を行なった。すなわち、飼育規模は 1.8 t (2.4 m²) 水槽で、性転換雄と通常雌の自然産卵で得られた全雌卵を用い、性分化時期に 20 °C の恒水温飼育による雄への転換阻止を施す種苗生産実験を行なった。

前出の自然産卵実験の性転換雄群と同一の産卵群から 1990 年 3 月 31 日および 1993 年 3 月 28 日に得られた卵を実験に用いた。1990 年の実験では、100 l 水槽を用いて仔魚期の飼育を行ない、日齢 40 に 1.8 t 水槽 2 基にそれぞれ 1,600 個体および 1,400 個体の変態期末期の仔魚を収容して飼育群 36-CT17 および 36-CT18 を設定した。1993 年の実験では、ふ化前日の胚形成卵を 1.8 t 水槽 2 基にそれぞれ 16,000 個ずつ直接収容し、飼育群 60-CT1 および 60-CT 2 を設定した。これらでは、日齢 40 に仔魚の計数を行ない、そのまま飼育数の調節を

行なわずに飼育を継続した。いずれの実験でも、日齢 40 から日齢 80 まで飼育水温を 20 °C に保った。日齢 80 に生残した稚魚を計数および測定し、生産実験を終了した。ただし、その中の 100~150 個体を引続いて飼育し、育成後性判定を行ない、作出種苗の性比を調べた。

Table 24 に各雌性化種苗生産実験における仔稚魚の生残率、生産魚の個体数と全長、および性比について示した。

36-CT 1 および 36-CT 2 は飼育密度の低い飼育実験例であり、種苗生産の過程は順調で、仔稚魚の成長および生残はきわめて良好であった。いずれの飼育群も雌 100 % であった。ちなみに、通常水温で飼育された姉妹飼育群である 36-1 は、雌の割合は 76.2 % で、20 % 以上の雄の出現がみられた。

一方、60-CT 1 および 60-CT 2 は飼育密度の高い飼育実験例であり、36-CT 1 および 36-CT 2 に比較して稚魚期の成長および生残がやや劣る結果となった。しかし、生産密度は 60-CT 2 が 36-CT 2 の 6 倍以上（個体数）にも及び、実際の種苗量産における生産密度も大きく上回り、多数の生産種苗が得られた。60-CT 1 および 60-CT 2 の雌の割合はそれぞれ 91.1 % および 84.0 % であり、9~16 % の雄の出現がみられた。しかし、通常水温で飼育された姉妹飼育群である 60-1 では、雌の割合は 54.8 % で、50 % 近い雄が出現しており、60-CT 1 および 60-CT 2 における雌の割合の増加は明らかであった。

このように、準量産規模による飼育実験によって、実際に雌性化種苗の大量生産が可能であることが実証された。すなわち、雌性化種苗量産には、性転換雄と通常雌の自然産卵で得られた全雌卵の使用（遺伝的性の統御）と、飼育水温の制御による雄への性分化の転換の阻止（性分化の統御）が有効な方法である。

3. 雌雄の成長差と雌性化種苗の成長特性

飼育されたヒラメに成長の雌雄差が著しく、雌が雄に勝ることは、原田ら（1983）および中本・小野山（1985）によって示され、さらに山本・増谷（1988）や田畑（1991）の雌性化種苗生産を目的とした研究の中でも確認されてきた。そこで、この差をより明確に示す目的で、遺伝的に均質な同一クローン内の雌雄の成長差について調査した。また、準量産規模で作出された雌性化種苗の飼育実験を行ない、成長過程を通常ヒラメと比較し、その養殖における有利性の実証を試みた。

1) クローン集団内での雌雄の成長差

ヘテロ型クローン（第 5 章）である作出群 53 HETCL（♀ 5・♂ 1）の 60 個体について飼育実験を行なった。日齢 181（1991年10月29日）に飼育を開始し、日齢 773（1993年6月13日）まで飼育を継続した。日齢 300（1992年2月26日）には、生殖口の観察および精液の搾出によって雌雄を調べ、ラテックス色素を無眼側の皮膚下に注入して雌雄の識別を可能とした。飼育群は、雌が 28 個体で、雄が 32 個体であった。飼育期間中に 2~4 カ月間隔で全長と体

Table 24. Survival, growth and sex distribution of each rearing lot in the female seed producing experiment.

Code number of rearing lot	Survival rate			Survivals at 80th day after hatching		Sex distribution		
	(days after hatching)			Number	Total length Ave. \pm SD	Sample size	♂ : ♀	Percentage of females
	0~40	40~80	0~80					
36-RT17	78.0	80.1	62.5	1,282	67.6 \pm 9.02 ^{mm}	95	0 : 95	100
36-RT18	78.0	82.0	64.0	1,148	71.5 \pm 4.60	90	0 : 90	100
60-RT1	65.2	49.7	32.4	5,184	59.8 \pm 6.64	124	11 : 113	91.1
60-RT2	75.3	62.2	46.8	7,495	59.2 \pm 6.09	131	21 : 110	84.0

Table 25. Length and weight measurements of females and males in the cloned group (53 HETCL(♀5 ♂1)) during the growth experiment.

Days of age Date		Group n = 60	Female n = 28	Male n = 32
181	TL (mm)	180.9 ± 6.56 ¹⁾	—	—
10.29	BW (g)	60.8 ± 7.70	—	—
239	TL (mm)	224.1 ± 6.75	—	—
12.26	BW (g)	125.8 ± 13.64	—	—
301	TL (mm)	244.1 ± 7.49	248.0 ± 7.21	240.5 ± 5.71
2.26	BW (g)	184.1 ± 16.13	187.6 ± 18.24	180.9 ± 13.09
361	TL (mm)	262.3 ± 14.50	275.1 ± 8.75	250.3 ± 6.12
4.27	BW (g)	233.5 ± 36.10	263.5 ± 27.09	205.4 ± 14.15
445	TL (mm)	289.9 ± 27.51	317.6 ± 10.29	265.7 ± 8.25
7.20	BW (g)	301.9 ± 89.03	391.6 ± 37.76	223.4 ± 20.27
529	TL (mm)	314.2 ± 37.54	352.5 ± 11.54	280.6 ± 10.85
10.12	BW (g)	355.3 ± 129.22	485.0 ± 57.36	241.8 ± 28.62
643	TL (mm)	355.4 ± 52.46	410.0 ± 13.68	307.6 ± 10.02
2.3	BW (g)	623.0 ± 286.04	916.9 ± 108.66	365.8 ± 36.61
773	TL (mm)	377.6 ± 66.86	447.3 ± 18.88	316.9 ± 11.32
6.13	BW (g)	713.3 ± 373.96	1098.5 ± 140.57	376.9 ± 43.19

1 : Average ± standard deviation.

重を測定し、成長経過について調査するとともに、雌雄の成熟の状況も調べた。

Table 25 に各測定時の全長と体重の平均値と標準偏差を示した。さらに、Fig. 9 および Fig. 10 に全長組成および体重組成の変化を示した。

飼育群は、日齢 181 から日齢 300 にいたる間、全長および体重とも顕著な変異幅の増大を示さぬまま増加した。日齢 300 における雌雄差はわずかであり、全長および体重とも、それぞれの範囲は重なり合い、平均値に有意な差は認められなかった ($p > 0.1$)。満 1 歳の時点で、雄はすべての個体から搾精することができ、その成熟が確認された。しかし、雌には成熟個体はみられなかった。日齢 361 で、雌は雄より大型となり、全長および体重の組成範囲ではやや重なるものの、平均値ではいずれも有意な差が生じた ($p < 0.01$)。さらに、日齢 445 では、全長および体重の雌雄の組成範囲は完全に分離し、平均値の相違も顕著になった。この時点で、平均体重では雌が雄の 1.8 倍となった。以後、雌雄による魚体サイズの差は増大し、平均体重は、日齢 529 で雌が雄の 2.0 倍、さらに日齢 773 で同じく 2.9 倍まで広がった。満 2 歳では、すべての雄の成熟が確認される一方、80 % 以上の雌で腹部の膨満がみられ、その成熟が推定された。また、水槽内での産卵もみられた。産卵期間の雌雄の成長は、雄で成熟による停滞が著しく、雌では未熟および成熟の別なく比較的良好な成長がみられた。

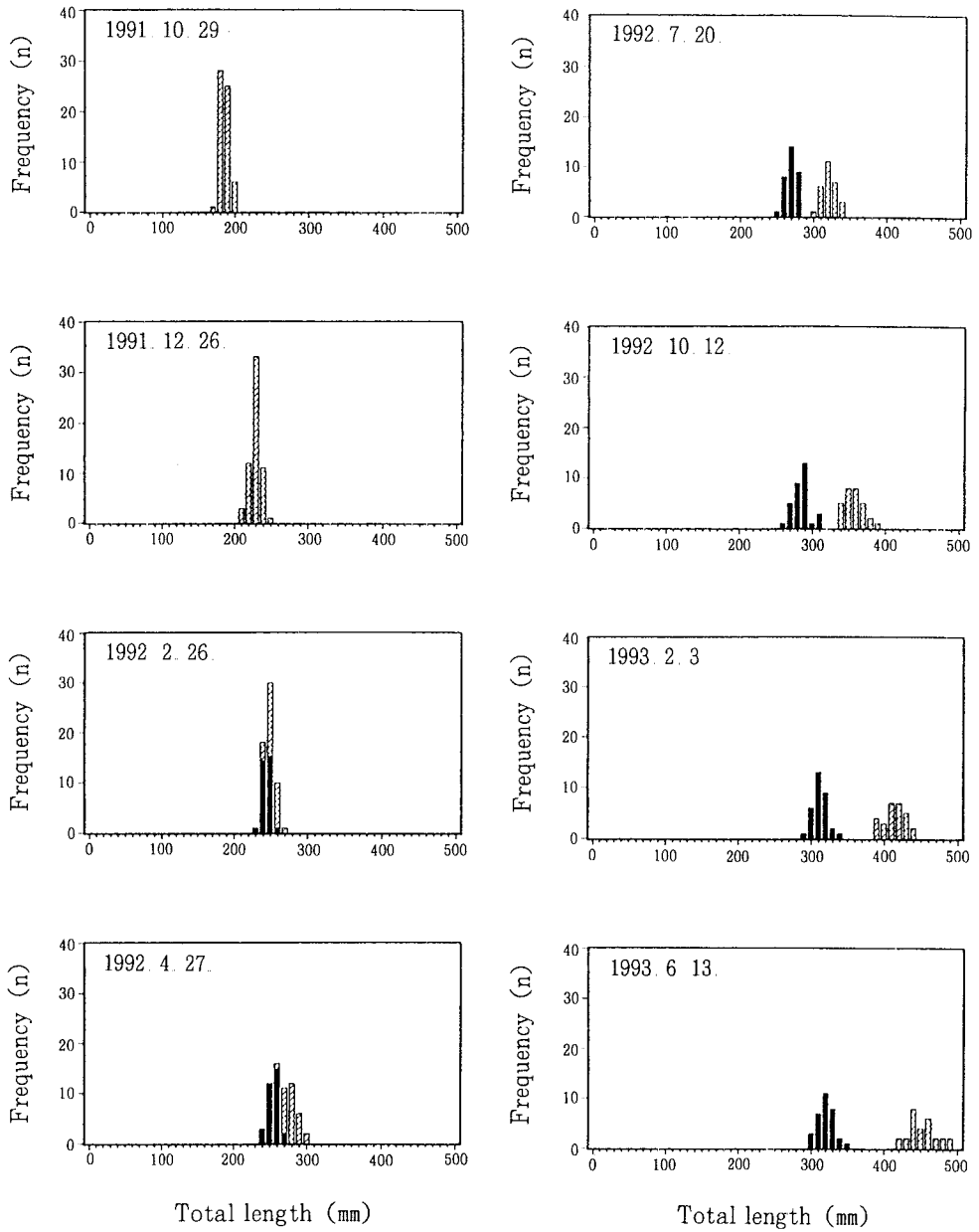


Fig.9. Histograms of total length showing the growth of fish in the cloned group (53 HETCL(♀5 • ♂1)) during the growth experiment. After 1992 Feb 26, solid column and striped column represent males and females, respectively.

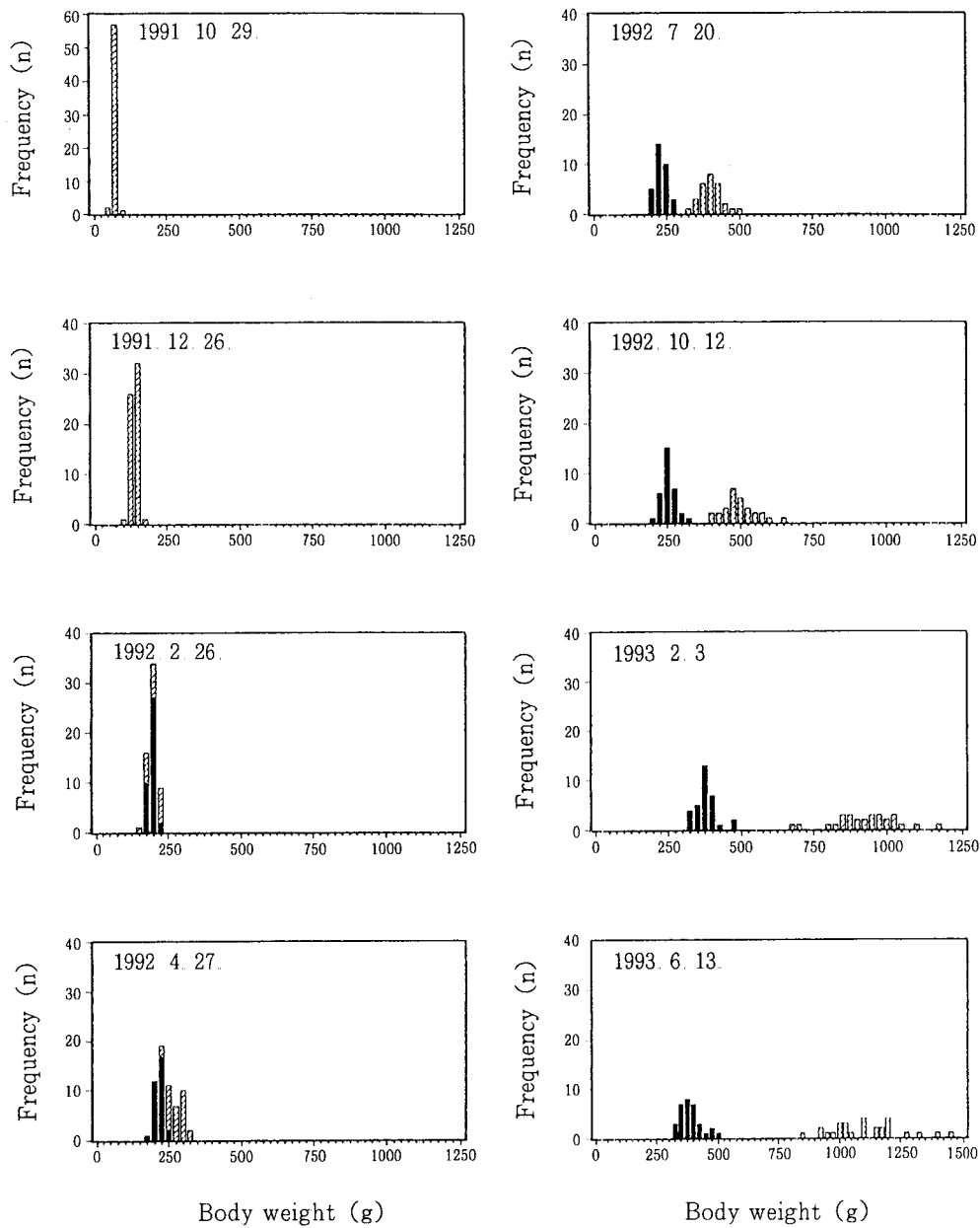


Fig.10. Histograms of body weight showing the growth of fish in the clonal group (53 HETCL(♀5 • ♂1)) during the growth experiment. After 1992 Feb. 26, solid column and striped column represent males and females, respectively.

この飼育実験によって、雌雄の成長差は、成熟の成長におよぼす影響に起因するものであり、雄の成熟体サイズが雌より小さく、成熟年齢も雌より低いことともに、雌雄で成熟時の成長の停滞の程度が異なることによっていることが確認された。また、クローン群は遺伝的に均質であり、雌雄の成長差は、遺伝的背景によるものではなく、表現型としての性によって生じていることが明らかとなった。

2) 性転換雄の次世代の雌性化種苗の成長特性

性転換雄と通常雌の自然産卵による作出群 36F₁SP(G1↑) の準量産規模での雌性化種苗生産群である 36-RT17 (雌性化群) を飼育実験に供した。日齢 200 (1990 年 10 月 20 日) に飼育を開始し、日齢 650 (1992 年 1 月 13 日) まで飼育を継続した。これには、対照として、飼育開始時点で雌性化群とほぼ同サイズの通常ヒラメ (通常群) を混合飼育した。後者は鳥取県栽培漁業センターで種苗量産されたもので、両群をラテックス色素によるマーキングで識別した。さらに日齢 350 (1991 年 3 月 19 日) に個体毎の性別を生殖口の観察および精液の搾出によって調べ、これもラテックス色素によるマーキングで識別した。雌性化群は雌 100 % であり、通常群は雌 38 % であった。飼育には 5 t 水槽を用いた。飼育数は、両群とも、飼育開始時で 50 個体であり、以後成長に合わせてランダムに間引きし、最終的にはそれぞれ 19 個体を飼育した。飼育期間中の 50 日毎 (日齢 300 を除く) に全長と体重を測定し、成長経過について調査するとともに、雌雄の成熟の状況も調べた。

Table 26 に各測定時の全長と体重の平均値と標準偏差を示した。さらに、Fig.11 に体重組成の変化を示した。

雌性化群では、満 1 歳で成熟する個体はみられなかった。生育はきわめて順調であり、冬期の低水温時に成長の停滞が認められたものの、その他の時期の体重の増加は著しく、ほぼ直線的であった。日齢 500 ですでに平均 1 kg を越え、日齢 650 で平均 1,769 g に達した。

通常群は、平均体重で、日齢 250 まで雌性化群を上回っていたが、日齢 350 に逆転して雌性化群より下回った。日齢 350 では、雄は全個体が成熟し、一方、雌は未熟であった。その時点で、全長および体重とも、雌雄それぞれの組成範囲は互に重複し、平均値で雌は雄をやや上回るものの、その差は小さく、有意ではなかった ($p > 0.1$)。日齢 400 においても、雌雄の差はやや広がったものの、ほぼ同様な状況が続いた。日齢 450 で、全長および体重とも、平均値に有意な雌雄差が生じた ($p < 0.01$)。日齢 550 以降では、全長および体重とも、雌雄それぞれの組成範囲が分離し、雌が雄を大きく上回った。このように、日齢 350 以前の 0 年魚では雄の生育も順調であり、日齢 350 で体重 770 g に達した雄個体も認められたが、以後の成熟期から夏期までの雄の成長の停滞は明らかであった。一方、雌は雄の成長停滞期も順調に生育し、日齢 500 に平均体重は雌性化群と同様に 1 kg を越え、雄の 1.5 倍となった。しかし、通常雌は全長および体重とも平均値で雌性化群を上回ることにはなかった。通常群は、1 歳以後成長の遅れる雄を含むために、群としての成長で雌性化群より大きく劣った。

この飼育実験によって、性転換雄と通常雌の自然産卵に由来する雌性化種苗は、生育におい

Table 26. Length and weight measurements of females and males in the all female group (36-RT17) and the control group of normal diploids during the growth experiment.

Days of age Date		All female group		Control group of normal diploids				
		Female		Group ¹⁾	Female		Male	
200	TL (mm)	269.7 ± 12.52 ²⁾		261.9 ± 13.48	-		-	
10 20	BW (g)	241.9 ± 34.93		247.5 ± 47.84	-		-	
250	TL (mm)	322.2 ± 18.18		318.4 ± 14.77	-		-	
12 9	BW (g)	413.7 ± 67.28		446.1 ± 72.45	-		-	
350	TL (mm)	366.9 ± 11.02		335.5 ± 18.32	341.9 ± 8.10	332.1 ± 21.15		
3 19	BW (g)	583.0 ± 65.51		505.0 ± 83.64	521.4 ± 45.18	496.2 ± 97.15		
400	TL (mm)	398.8 ± 14.96		350.2 ± 22.50	367.0 ± 7.75	340.4 ± 22.50		
5 8	BW (g)	755.5 ± 91.10		564.7 ± 106.80	627.1 ± 58.97	528.3 ± 111.49		
450	TL (mm)	427.2 ± 17.61		363.6 ± 29.10	389.9 ± 14.21	348.3 ± 24.20		
6 27	BW (g)	904.8 ± 117.25		643.7 ± 145.25	801.4 ± 104.12	585.0 ± 121.96		
500	TL (mm)	453.3 ± 17.29		388.8 ± 33.80	423.4 ± 16.64	368.6 ± 23.22		
8 16	BW (g)	1035.2 ± 133.48		798.4 ± 204.92	1015.7 ± 134.26	671.7 ± 111.19		
550	TL (mm)	483.9 ± 19.22		416.1 ± 36.26	450.5 ± 12.49	393.3 ± 22.83		
10 5	BW (g)	1254.6 ± 168.56		942.6 ± 253.80	1183.3 ± 135.48	778.3 ± 117.04		
600	TL (mm)	513.5 ± 20.04		435.5 ± 39.07	478.0 ± 16.94	410.8 ± 24.16		
11 24	BW (g)	1568.6 ± 225.94		1138.4 ± 318.04	1507.1 ± 146.36	923.3 ± 148.62		
650	TL (mm)	531.1 ± 21.09		446.4 ± 39.98	491.1 ± 14.32	420.3 ± 23.75		
1 13	BW (g)	1769.0 ± 243.43		1218.4 ± 341.41	1607.1 ± 162.28	991.7 ± 172.14		

1 : Female rate of the group is 35 per cent 2 : Average ± standard deviation

て正常であり、成長の速い雌を高率に含むことから、養殖効率において著しく優れていることが実証された。

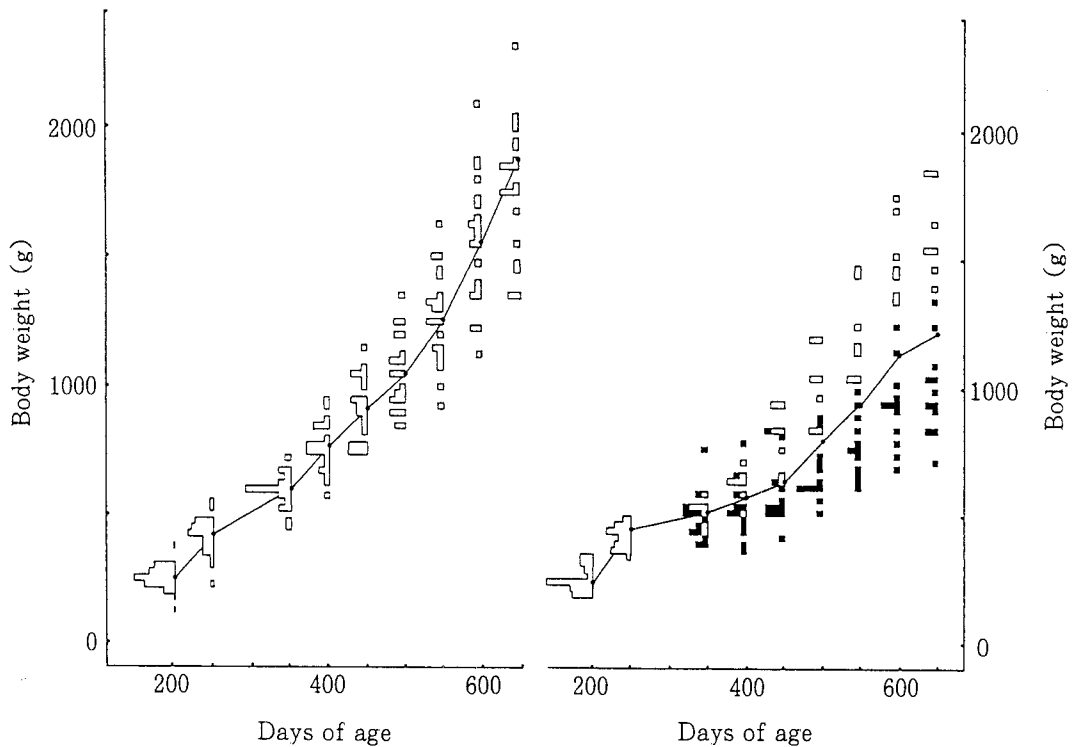


Fig.11. Growth in body weight (average and histogram) of the all female group (36-RT17, left) and the control group of normal diploids (right) during the growth experiment. After 350th day of age, solid portion and open portion represent males and females, respectively, in the control group.

4. 考 察

ヒラメの卵形成過程の特徴は、同じくカレイ目魚類のクロガレイにおけるその特徴 (Yamamoto, 1956) に類似していた。しかし、クロガレイでは、油球は出現せず、本研究で設けた油球期とは別に、卵黄胞期が区分されている。その他では、染色仁期および周辺仁期の卵母細胞の状況、卵黄胞の出現状況と最終的配置位置、卵黄胞の出現直後の卵黄顆粒の形成開始、および卵黄形成の状況においてよく一致した。しかし、両種には卵母細胞の発生様式に相違がみられた。クロガレイの場合、卵形成は同期的に進行し、排卵は1産卵期に1回に限られ、卵群同期発達型であり (高野, 1989)、また、比較的長い卵黄形成期を持つ。これに対して、ヒラメでは、繁殖盛期にすべての発達段階の卵母細胞が同時に卵巣内に存在し、明瞭に認められる卵群の突出を欠いており、典型的な非同期発達型であることが特徴である。生殖周期を調査したヒラメの雌には満2歳で初回成熟する個体が出現したが、成熟に至るまでに卵母細胞が油球期以前の発達段階に限られる静止期が長期間存在した。卵黄形成は産卵を開始する3月の直前にあたる1月から開始され、急速に卵母細胞の発達が進んだ。雌の繁殖期にさきがけた卵形成

期間は非常に短かった。

一方、ヒラメの雄では、満1歳に初回成熟し、満2歳でも同様の成熟がみられた。3月から6月までの繁殖期に向けての精子形成はすでに前年の10月から開始され、繁殖期後期の5月頃まで、およそ8カ月間続くことが観察された。このように、雄の繁殖期にさきがけた精子形成の期間は非常に長く、雌における卵形成の場合とは著しく異なった。

従来、ヒラメは2ヶ月以上の産卵期に数回の産卵が行われると考えられてきた(小野・奥村, 1984)。しかし、雌親魚の個体毎の1産卵期を通じた産卵状況を調査したところ、ヒラメは、3月下旬より6月中旬までの約3ヶ月間の長期に渡る産卵期を持ち、その間、ほぼ毎日産卵し、産卵頻度(産卵日数/産卵期間中の日数)は個体によって66%から88%の範囲の高い値を示した。また、産卵期間を通じて、魚体重1kgあたり340~400万粒におよぶ非常に多くの卵が産出された。このように、ヒラメは、非同期発達型の卵母細胞の発達様式に適合した多回産卵魚であることが判明した。

マダイも、ヒラメに似た産卵特性を持ち、松浦ら(1988)による雌親魚(体重約0.9kg)1個体による産卵実験から、5月中旬から6月下旬までの1ヶ月半に渡る産卵期に、68%の高い産卵頻度を示し、産卵数も多数(190万粒)におよぶことが知られている。マダイでは、産卵期間中に順次卵黄胞期以下の卵母細胞から補充を受けて毎日排卵し(松浦, 1972)、さらに、1日における卵巣卵の卵黄蓄積、成熟、および排卵の過程と、血中ステロイドホルモン量の増減がよく対応し、卵の最終成熟に至る一連の生理的日周リズムが存在することが確認されている(Matsuyama *et al.*, 1988; Kagawa *et al.* 1991)。このことは、非同期発達型の卵母細胞の発達様式における卵の形成および成熟の典型であり、ヒラメにおいても共通することと考えられる。実際に、ヒラメでも、卵の最終成熟に至る日周リズムの存在を示唆する血中ステロイドホルモン量の増減が観察されている(足立, 私信)。

また、ヒラメの産出する卵はきわめて多量におよび、上述の魚体重1kgあたりの1産卵期の産卵量を未受精の搾出状態の卵重量に換算すると約2kgにも相当する。これは、産卵期間中にも卵形成、とくに卵黄形成が極めて盛んに行なわれる結果であり、その間、成熟魚が生殖的に高い生理的活性を維持することを示唆している。このことは、産卵群の飼育において、雌ではきわめて活発な摂餌が観察され、しばしば産卵期にも体重が大きく増加すること(たとえば性転換雄と通常雌による産卵群E)と関連していると思われる。なお、雄は産卵期に摂餌が不活発であり、体重はあまり増加せず、雌とは大いに異なっている。

このようなヒラメの雌親魚の非同期発達型の卵母細胞の発達様式に一致した成熟および産卵特性は、水槽内での自然産卵による採卵は容易であるが、搾出採卵による人工受精がきわめて効率的ではないことを意味している。実際、ヒラメの通常種苗の量産現場では、搾出採卵ではなく、一般に自然産卵方式による採卵方法が採用されている。一方、著者は、搾出による採卵では、体重2kg程度の雌親魚から1回に得ることのできる卵はせいぜい10万粒であり、しかも、搾出操作による雌親魚の卵形成への悪影響から、搾出採卵は同一個体について1産卵期に3、4回が限度であることを経験的に知り得ている。さらに、この方法では、良質卵を安定して得ることは難しい。また、採卵への生殖腺刺激ホルモンによる排卵誘発の適用が検討され

ているものの（平本，1981；田畑，1991），これも良質卵を得る方法としては優れたものではない。それゆえ，搾出採卵は，染色体操作を行なううえでは必須のものであるが，種苗の大量生産を前提とした生産現場での応用には適当なものではないと考えられる。そこで，ヒラメの雌性化種苗生産を量産規模で実現するためには，自然産卵による採卵によっても遺伝的性の雌への統御を達成できることが必要である。

性転換雄（第2極体放出阻止型雌性発生2倍体雄）と通常雌による産卵群の産卵実験を行なったところ，通常雌雄による対照の産卵群を上回る採卵成績が得られた。すなわち，性転換雄の放精行動は正常であり，性転換雄を用いた自然産卵による採卵によって，全雌卵（XX卵）が容易に大量作出できることが確かめられた。この実験で得られた卵は量的にも質的にも満足できるものであり，産卵期間も3月から6月の長期におよんだ。この方法では，雌親魚の生産する卵を無駄なく活用でき，産卵期の開始初期から長期に渡って安定的に全雌卵を供給することが可能である。これには，通常の種苗生産におけると同様，比較的少数の雌親魚を卵の必要量に応じて準備すればよく，搾出採卵を前提とした親魚養成よりはるかに経済的である。通常の種苗生産と雌性化種苗生産の相違は後者における性転換雄の親魚としての利用のみであり，採卵成績は使用する雌親魚の資質に負うところが大きいものと考えられる。

自然産卵によって得られた全雌卵を用いて準量産規模での種苗生産実験を行なったところ，雌の割合が84%から100%の種苗を多数生産することができた。この実験では，雄への性分化の転換を阻止する目的で，稚魚の性分化時期を含んだ変態着底後の40日間に20℃の恒水温飼育を行なった。その結果，通常水温で飼育された姉妹群（雌の割合：55～76%）より雌の割合を24%から29%高めることができた。このことは飼育水温の制御による性分化の統御が量産規模の雌性化種苗生産においても適用可能であることを実証するものと考えられる。この生産実験においては，飼育水温条件は同一であったが，飼育密度の低い生産例で全雌の種苗が得られる一方，最も高い飼育密度の生産例で16%の雄の出現がみられた。このことは雌への性分化が稚魚の良好な成長をもたらす好適飼育環境下でより正常に進行することを示しているのかもしれない。しかし，飼育密度と遺伝的雌の雄への転換の頻度との関連は，未だ明らかではなく，性分化機構を知るうえで興味深い課題として残された。

いずれにしても，自然産卵で得られた性転換雄次世代の種苗生産によって，ヒラメの雌性化種苗の大量生産が可能であることが確認された。ヒラメの雌性化種苗生産は，性転換雄の確保によって，既存の生産現場で，ほぼ従来どおりの方法で実施可能である。今後は，現場での生産例の蓄積の過程で，より確実な性転換の阻止条件を検討することや，親魚の成熟時期の人為的統御（伊島ら，1986）を雌性化種苗生産に応用して生産時期を制御するなど，合理的な飼育管理を目的とした技術改良が必要であろう。

飼育されたヒラメに成長の雌雄差が著しく，雌が雄に勝ることは，原田ら（1983）および中本・小野山（1985）によって示され，さらに山本・増谷（1988）や田畑（1991）の雌性化種苗生産を目的とした研究の中でも確認されてきた。このことは本研究におけるクローン群の飼育実験によっても同様に示された。クローン群は遺伝的に均質であり，雌雄の成長差は，遺伝的背景によるものではなく，表現型としての性によって生じていることが明らかとなった。同一

クローン内の雌雄は、日齢 301 まではほぼ同サイズであったが、以後雌雄の成長差が広がり、平均体重は、日齢 445 で雌が雄の 1.8 倍、日齢 529 で同じく 2.0 倍、さらに日齢 773 で同じく 2.9 倍まで広がった。このような雌雄の成長差は明らかに性徴であり、成熟の成長に及ぼす影響に起因するものであると考えられる。その第 1 点は、雄の成熟年齢が雌より低く、生物学的最小型が雌と比較して小さいことである。さらに、第 2 点は、すでに雌雄の成熟および産卵特性との関連から論議したように、雌雄で成熟時の成長速度が大きく異なり、雌が雄を著しく上回ることである。

性転換雄と通常雌の自然産卵によって得られた全雌卵をもとに準量産規模で作出された雌性化種苗は、飼育実験においてきわめて良好な成長を示した。これは混合飼育した対照の通常ヒラメの雌をも成長において上回った。しかし、通常ヒラメでは、雄の成長の停滞がみられ、群としての成長成績で雌性化群より大きく劣った。このことから、性転換雄と通常雌の自然産卵に由来する雌性化種苗は、生育において正常であり、養殖効率において雌雄混合の通常ヒラメよりも著しく優れていることが実証された。

このように、ヒラメの雌雄の成長差は著しく、雌の割合を高めた雌性化種苗は良好な成長を示すことが確認された。ヒラメ養殖における雌性化種苗の利用は、養殖期間の短縮を実現するとともに、大型魚生産において有効であり、きわめて経済性が高いものと考えられる。