

ヒラメ雌化誘導のための 雌性ホルモン投与条件について

山田 嘉孝・大野 和憲*・金子 信一・玉井 雅史

はじめに

ヒラメでは雄より雌の成長が速く^{1),2)} 養殖上有利なことから、染色体操作や性ホルモン処理による種苗全雌化の研究が行われている。^{3),4),5)} 大野は⁶⁾ ヒラメ雌化誘導にエストラジオール-17 β の経口投与と処理が有効であることを報告したが、今回の試験では、エストラジオール-17 β の濃度および投与時期・期間に関する検討を行ったので報告する。

1. ホルモン濃度に関する試験

材料と方法

1) 供試魚および飼育方法

供試魚は、1989年5月12日に天然親魚から搾出した卵を用い、ふ化後500 μ lポリカーボネート製円形水槽に収容(1.4万尾)し、シオミズツボワムシ、アルテミアおよび配合飼料(日本農産工業株)により68日間飼育したものである。ふ化後69日目から200 μ lポリカーボネート製水槽5槽に各80尾収容して、ホルモン添加餌料の経口投与を開始し、7/19~8/30(日令69~112)の43日間投与した。ホルモン投与期間中は、ホルモン添加した魚肉ミンチのみを与え、投与終了後~日令142ではミンチ、その後性別判定時まではイワシの細片を与えた。ミンチの組成は、イワシ3 ϕ :オキアミ1+

ビタミン剤(イワシプラスS;ファイザー製薬株)とした。

ホルモン投与期間中の水温は、18.9~27.1 $^{\circ}$ Cの範囲で推移した。

2) ホルモン濃度

ホルモン処理は、エストラジオール-17 β (以下E₂と略記)の経口投与により行った。E₂は、100%エタノールで溶解して原液濃度を4.0mg/mlとし、室温で保存し、使用時に50%エタノールによって100 μ g/mlに希釈後、設定濃度となるようにミンチに添加した(表1)。濃度は、ミンチ湿重量1gあたりに含まれるホルモン重量によって表した。

3) 性別判定

E₂投与終了後飼育を継続し、日令195~207に全生残個体の雌雄を調べた。性別判定は、解剖による生殖腺の形態観察と、摘出後ホルマリン固定した生殖腺を顕微鏡観察することにより行った。

結果と考察

供試魚の平均全長は、E₂投与開始時(日令69)35.0mm、同終了時(日令112)93.5mmであり、さらに性別判定時(日令195~207)では202.7mmであった。

生残は、ホルモン投与開始後の21日間に平均生残率56%と半減したが、その後の生残は良好で、性別判定

表1 E₂濃度とヒラメ雌の出現率

試験区	E ₂ 濃度 (μ g/g)	個体数(尾)		雌の割合 (%)
		♂	♀	
1(対照区)	0	27	12	31
2	0.5	3	36	92
3	1.0	0	39	100
4	5	0	37	100
5	10	0	41	100

* 千葉県水産部栽培漁業課

時の平均生存率は49%であった。初期の死因は主に共食によるものであった。

性別判定の結果は、対照区（1区）での雌の出現割合が31%であったのに対し、 E_2 を $1.0 \mu\text{g/g}$ 以上の濃度で投与した3, 4, 5区では、その全生存個体が雌であった（表1）。 E_2 を $0.5 \mu\text{g/g}$ で投与した2区でも雌の割合は92%に達した。 $1 \mu\text{g/g}$ 以上の濃度で雌の出現率が100%になるという結果は、投与期間を19.3mm（日令56）から開始している点でやや異なるものの、田中³⁾の報告と一致している。

しかし、雌の生殖腺形態は、対照区ですべての卵巣に後方への伸長が見られたのに対し、 E_2 投与区の雌では、伸長の認められない卵巣を持つ個体もあった。この伸長の有無は魚体の大きさとは無関係であった。

2. ホルモン投与時期に関する試験

材料と方法

1) 供試魚および飼育方法

供試魚は、1990年5月11日に天然親魚から採出した卵を用い、1t 黒色ポリプロピレン製円形水槽（2.4万尾収容）でワムシ、アルテミアを給餌し飼育したものである。200ℓ水槽6槽に各112尾を収容した後、日令75より試験区ごとに E_2 添加餌料の経口投与を行い、試験を開始した。試験期間中の餌料は、日令134まで全試験区ともミンチを一定量与え、以後性別判定の日令219~228まではイカナゴを与えた。

なお、 E_2 投与期間中の水温は、19.1~27.7℃の範囲で推移した。

2) ホルモン濃度

E_2 濃度は $1.0 \mu\text{g/g}$ とし、 E_2 投与期間別に6通りの試験区を設定した（表2）。1区は E_2 無投与の対照区とし、投与期間はヒラメの成長経過から20日間を一

区切りとした。その他は前試験に準じた。

3) 性別判定

性別判定は、日令219~228の全生存個体について、1の試験と同様の方法により行った。

また、 E_2 投与魚の生殖腺形態を数値化するため、

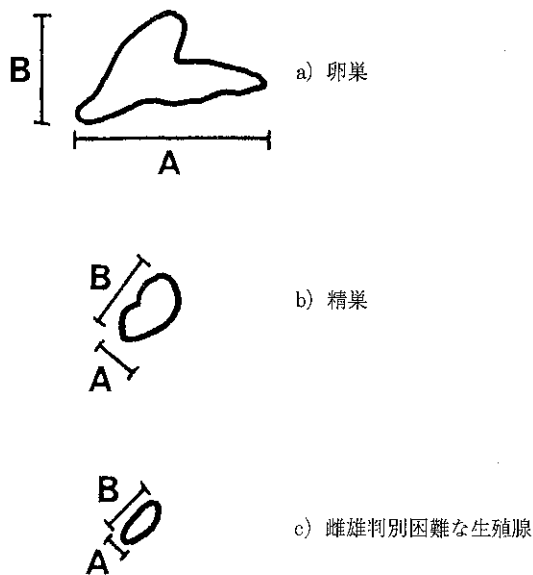


図1 各種生殖腺形態と測長部位

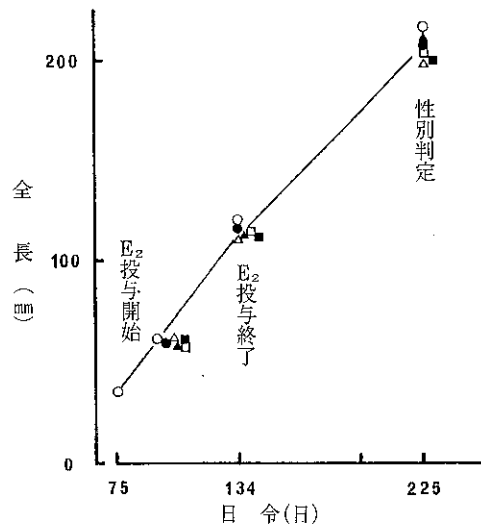


図2 E_2 投与試験期間中の成長(1990)

○：1区，●：2区，△：3区，▲：4区，□：5区，■：6区の平均全長

表2 E_2 投与期間

試験区	E_2 投与期間			
(日令)	75	95	115	135日
1	無投与			
2	●	○		
3	●	○		
4	●	○		
5		●	○	
6		●	○	

解剖時に、卵巣については全長および体高長に対する長さを、精巣および雌雄判別困難な生殖腺については、長径と短径を測定した(図1)。

結果

試験期間中の成長、生残をそれぞれ図2、図3に示した。平均全長は、試験開始時(日令75)34.8mm、E₂投与終了時(日令134)115.2mm、性別判定時(日令219~228)206.7mmであり、対照区の成長がやや良かったものの、試験区ごとの差はほとんど無かった。試験開始後の生残は、E₂投与終了時の平均生残率75%、性別判定時64%で比較的良好であった。

性別判定の結果は表3に示した。雌の割合は、対照区4%に対して、E₂投与区では54~100%と高率であった。投与期間については、20日間の処理(2区、6区)では雌の出現率は85%以下であり、40日以上(3区、4区、5区)の投与で95%以上となった。また投与時期については6区のように成長がかなり進んでからの

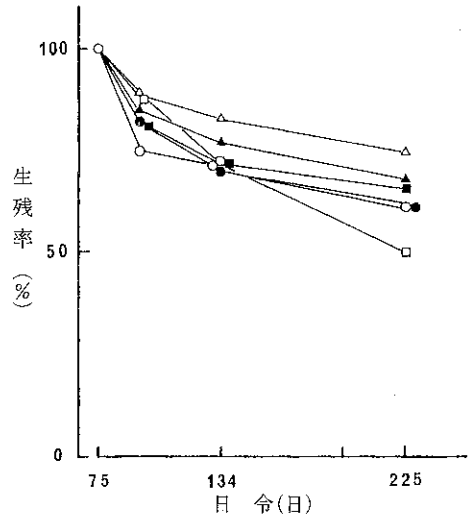


図3 E₂投与試験期間中の生残率(1990)

○：1区，●：2区，△：3区，▲：4区，□：5区，■：6区の平均全長

表3 E₂投与期間とヒラメ雌の出現率

試験区	投与期間	投与時日令 (日)	投与時全長 (mm)	個体数(尾)		雌の割合 (%)
				♂	♀	
1	無投与			65	3	4
2	前期20日	75-94	34.5-59.8	31	37	54
3	前期40日	75-114	34.7-85.7	4	80	95
4	全期60日	75-134	33.3-112.8	0	77	100
5	後期40日	95-134	57.0-116.1	1	55	98
6	後期20日	115-134	91.1-112.4	12	62	84

表4 E₂投与期間と卵巣形態(測定結果)

試験区	A ± SD (mm)	B ± SD (mm)	A/B	雌個体数(尾)
1	19.1 ± 8.2	13.4 ± 3.2	1.36	3
2	13.6 ± 2.7	10.6 ± 1.8	1.30	37
3	11.1 ± 3.1	10.7 ± 2.3	1.06	80
4	10.5 ± 3.4	10.8 ± 2.4	0.98	77
5	4.1 ± 2.4	8.0 ± 1.8	0.51	55
6	2.6 ± 2.5	5.8 ± 1.5	0.44	62

A；全長方向の長さ

B；体高長方向の長さ

投与でも、 E_2 の効果が十分に認められた。

各試験区の卵巣の測定結果を表4に示した。対照区の卵巣が後方へ長く伸長しているのに対して、2~4区の卵巣はその伸長(A)が短く、体高軸方向の長さ(B)も短かった。また、5区、6区で観察された卵巣は、色、形、大きさ等の外見からは卵巣と判断できないほどの矮小なものがほとんどであり、これらは顕微鏡観察による卵母細胞の確認によってそれを判断し得た。一方、雄の精巣については、 E_2 投与区でのサンプルが少なかったが、 E_2 投与区においても、外見上判別可能な精巣がほとんどであった。

考 察

今回行った日令75~134の試験期間においては、40日間の投与によって雌の割合がほぼ100%となった。

また、 E_2 投与の有効時期に関して、これまで行われた試験での E_2 投与時期は、仔魚への浸漬によるホルモン処理も含めて、長くとも全長90mm程度までであるが、^{3), 4), 5)} 今回の試験では全長91~112mm(日令115~134)というさらに遅い時期での投与によっても、高率な雌化が可能であった。

E_2 投与魚に見られる卵巣の形態異常については他の報告^{3), 4), 5), 6)}でも観察されているが、この現象はヒラメにおける性決定時期を反映しているものとも考えられ、有効な E_2 投与時期を推察する手掛かりになり得る。すなわち、後期からの投与によって、ほとんどの雌の卵巣が矮小な形態のままであったという結果は、雄になるべき決定がすでにある程度なされた後人為的な雌化を試みたために見られた現象であり、後期の E_2 投与が生殖腺組織のレベルでの雌化は可能とするが、生殖腺の外形にまで影響を及ぼすことはできなかったものと考えられる。³⁾ こうした卵巣の形態的雌化が不可能となる境界点は、3区で矮小な卵巣が見られず、5区においてほとんどの雌の卵巣が矮小であることから、全長35~57mm前後に存在すると思われる。一方、初期からの投与で、投与期間が長いほど卵巣の突起の伸長が短くなるのは、 E_2 の過剰の投与による影響ではないかと考えられる。

ヒラメの性分化においては、雌では30~50mmの早期に卵巣腔形成が観察されるが、雄の生殖腺では長期間の未分化の状態が続いた後、全長50~100mm以上で精母細胞の出現が見られるとされている。これによれば、正常な生殖腺を持つ雌への誘導には早期からの E_2 投与が必要だが、組織内に卵母細胞を形成するだけの雌化であれば、比較的遅い時期の E_2 投与でも有効であ

るという今回の結果を説明できる。

今回の結果をふまえて、雌性ホルモン投与の有効時期を考えると、単に組織学的な雌化であれば6区の例から全長90mm以上でも可能であり、一方、正常な卵巣を形成させる雌化が必要ならば、本実験に関する限り、35mmサイズからの投与が必要で、35mm以前の処理は必要ないと考える。また、矮小な生殖腺がその後発達するのか否かは不明である。

しかし、こうした不完全な卵巣を持つ個体に関して、成長など他の面で差異を生ずる可能性があり、今後その特性について比較検討する必要がある。

これまでの試験から、全雌種苗作出の方法として雌性ホルモンの経口投与が非常に有効であることが判明したが、ホルモン使用の実用化にあたっては、食品としての安全性に関する試験研究を今後行う必要がある。

要 約

- 1) ヒラメ稚魚に雌性ホルモン(エストラジオール-17 β)を経口投与し、雌化誘導のための有効濃度を調べた。
- 2) その結果、対照区の雌31%に対して、雌性ホルモン1.0 μ g/g以上の投与区で雌の割合が100%になった。
- 3) さらに、雌性ホルモン投与の有効時期および期間について検討した。
- 4) その結果、対照区の雌4%に対して、40日間の投与で雌の出現率が90%以上になった。
- 5) また、全長90mmという遅い時期からの雌性ホルモン投与によっても高率な雌化(84%)が可能であった。しかし、遅い時期からの投与により雌化した個体では、矮小な卵巣を持つものがほとんどであった。

文 献

- 1) 原田輝雄・村田 修・宮下 盛・小田誠二・清水清和(1983): 養殖ヒラメの雌雄による成長度の相違について、昭和58年度日本水産学会春期大会講演要旨集, 125.
- 2) 中本幸一・小野山弘(1985): 飼育ヒラメにおける雌雄の成長差について、兵庫水試研報, 23, 57-61.
- 3) 田中茂樹(1988): ヒラメの生殖腺の性分化に及ぼすエストラジオール-17 β の影響、養殖研報, 13, 17-23.
- 4) 山本栄一・増谷龍一郎・三木教立・小林啓二(1987):

- ヒラメの染色体操作技術等を応用した優良種苗生産に関する研究-I, 鳥取栽漁試事報, 5, 66-87.
- 5) 田畑和男 (1989): β エストラジオールによるヒラメの人為的雌化と性分化時期の推定, 兵庫水試研報, 26, 19-36.
- 6) 大野和憲 (1989): 性ホルモン処理によるヒラメの性分化誘導および餌料の違いによる性比の変動, 千葉水試研報, 47, 45-48.
- 7) 田中茂樹 (1987): ヒラメの生殖腺の性分化過程, 養殖研報, 11, 7-19.