

ヒメマス性転換技術改善試験

誌名	栃木県水産試験場研究報告
ISSN	13408585
著者	沢田, 守伸 土居, 隆秀 加賀, 豊仁 吉田, 豊
巻/号	48号
掲載ページ	p. 68-75
発行年月	2005年3月

ヒメマス性転換技術改善試験

— 雄性化技術におけるホルモン剤利用の縮減 —

(平成15年度)

沢田 守伸・土居 隆秀・加賀 豊仁・吉田 豊

目 的

MTを飼料に添加して対象魚に与える経口投与法は雄性化にきわめて有効であり、性転換雄魚の作出に広範に利用されている。この方法ではMT添加量を飼料1 kgあたり1 mgとすることが一般的である。餌付け期は魚を飼料に馴らすため、魚の要求量より多い飼料を撒布する必要があり、結果としてMT使用量が多くなりがちである。また、MTを含んだ排泄物や残餌が発生することから、MTの飼育環境外への漏出が懸念されている。

そこで前年度に引き続き、 17α -メチルテストステロン（合成雄性ホルモン、以下MTと略記）の使用量を大幅に縮減、もしくはまったく使用せずにヒメマスの遺伝的雌を雄性化する技術について検討した。

なお、本試験は養殖研究所日光支所（現中央水産研究所内水面研究部）東照雄室長の指導のもと、共同で計画・実施した。

方 法

供 試 魚 2000年から2003年まで表1のとおり全雌群を作出し、その都度試験に供した。2001年からの3年間は、全雌群作出に使用した卵に通常雄を媒精した性比期待値1:1の群を準備し、全雌無処置群とあわせ対照として使用した。2003年に使用した性転換雄魚を除き、親魚には中禅寺湖漁業協同組合が池中養成したヒメマスを用いた。2003年は、本試験を通して得られた性転換雄魚（2001年処理群）を全雌群作出に使用した。

作出した卵は養殖研究所日光支所（以下、支所と略記）のふ化施設（水温約9℃）に收容し、発眼まで管理した。発眼卵は試験区数に応じて無作為に取り分け、試験計画に基づきそれぞれの処理を施した。

飼育条件 処理期間を含め、受精後約1年は60cm水槽で試験区別に管理した。それぞれの処理が生残率や成長へ及ぼす影響を調べるため、処理終了直後の3月、試験区ごとに総尾数、総重量を調査した。受精後1年以降は、鱗切除による標識を施して2トン円形ボ

表1 供試魚（全雌群）の作出

	作出 月日	作 出 方 法	採卵数	発眼率
2000年度	9/21	性転換雄魚媒精	14,145粒	43.7%
2001年度	9/13	雌性発生(加圧法)	16,381粒	52.1%
2002年度	9/19	雌性発生(加圧法)	18,369粒	23.5%
2003年度	9/18	性転換雄魚媒精	13,998粒	80.2%

【雌性発生（第2極体放出阻害）の方法】

精子の遺伝的不活性化処理：

径15cmフラットシャーレにヒメマス精漿で100倍に希釈したヒメマス精液1.5mlを伸展し、15W紫外線ランプ下25cmで90秒間照射。

倍数化処理：

卵2,500粒前後に対し、遺伝的不活性化処理を施した希釈精液30mlを媒精し、媒精後25分から650kg/cm²で6分間加圧。

リエチレン水槽3面に混養した。

飼育槽は支所飼育用水（湧水：水温約9℃）のかけ流しとし、供試魚には市販配合飼料を与え成熟期まで育成した（2002年、2003年作出魚は現在も飼育中）。各年級群とも飼育スペースの制約により、適宜、個体数の間引きを行った。

性の判別方法 作出後2年目ないし3年目の成熟期（9月）に供試魚を開腹し、生殖腺を直接観察した。併せて、生殖腺重量を測定し、精液が排出可能な個体は精子活性の観察も行った。肉眼あるいは実体顕微鏡下で卵巣・精巢の区別がつかなかった生殖腺は、常法により薄切組織標本を作成し光学顕微鏡による観察で雌雄を判定した。また、成熟期以前に死亡した個体、間引きを行った個体についても上記と同様の方法により雌雄を判別した。なお、組織標本の光学顕微鏡観察によっても雌雄の別を判断できなかった個体については「判断不能」と分類した。

[試験1] MT浸漬法による雄性化

ヒメマスなど餌付け期以前からMT処理を開始する必要のある魚種では、経口投与法と併せてMT溶液への浸漬法が使われている。浸漬法で使われるMTの量は経口投与法に比べ少なく、かつ管理区域内に封じ込

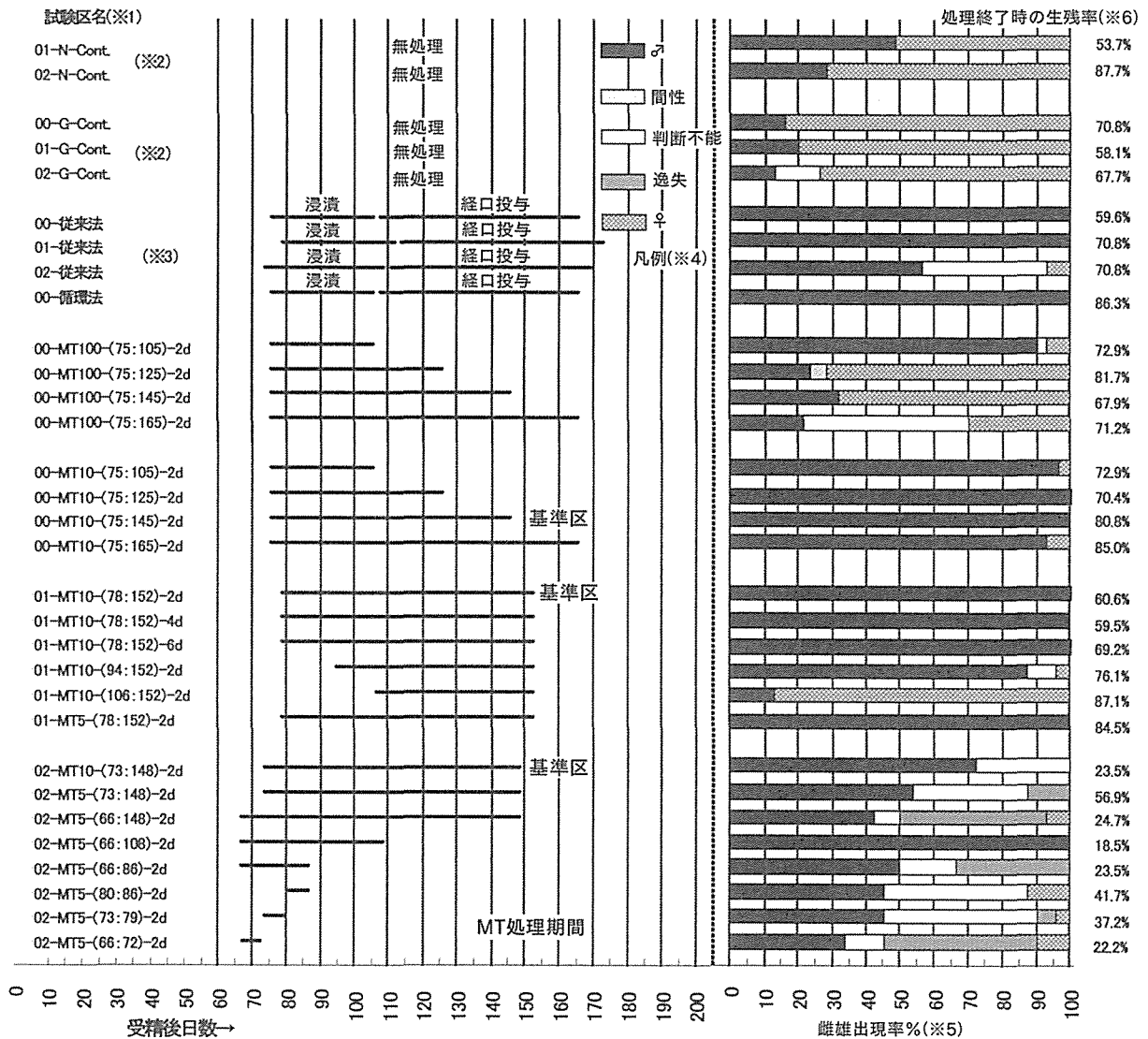


図1 MT浸漬処理の方法と処理結果 (2004年3月現在)

- ※1 先頭の数字は処理年度(西暦)、MTに続く数字は浸漬液のMT濃度(μg/l)、続く()内の数値は処理期間(受精後○日～○日まで)、最後尾の記号「d」に付く数字は処理頻度(3時間の浸漬処理を○日に1回)を表す。
- ※2 N-Cont.はMT処理を行わなかった通常受精群(雌雄混合群)、G-Cont.はMT処理を行わなかった全雌群。
- ※3 従来法とはふ化から浮上までMT10μg/l溶液に1回/5日の頻度で2時間浸漬処理、浮上から浮上後60日まで1kgあたり1mgのMTを添加した飼料を投与する方法。循環法とは従来法を循環水槽(閉鎖型)内で実施する方法。
- ※4 「判断不能」とは雌雄の区別ができなかったもの、「逸失」とは組織標本を作成する過程で生殖腺を見失ったものを指す。
- ※5 2000年度及び2001年度処理群の値は成熟期に採集した個体の観察結果、2002年度処理群は生殖腺の発達が進んでいない段階での組織標本観察結果を記載。
- ※6 2000年度処理群は受精後177日、2001年度処理群は受精後163日、2002年度処理群は受精後181日の生残率を示す。

めることも比較的容易である。しかし現状では、浮上後には経口投与方法に切り換えることが必要とされている。

そこでMT使用量を減じ、かつMTの環境への漏出を抑止することを目的に、経口投与を併用しない浸漬法のみによる雄性化処理条件を検討した。

試験区設定 浸漬法によるヒメマス性転換雄魚作出

条件を探るため、処理期間、浸漬頻度、浸漬液濃度について表2、図1のとおり試験区を設定した。なお、1回の浸漬時間は3時間に統一した。

対照としてMT処理を施さない全雌群、雌雄混合群を配置した。また、現在ヒメマスの性転換雄魚作出に用いられているMT浸漬処理と経口投与の併用法(従来法)区を設けた。

表2 MT処理を行った供試魚の性比

試験区名	検査尾数	性比 (%)				
		♂	間性	判断不能	逸失	♀
01-N-Cont.	38	47.4	0.0	0.0	0.0	52.6
02-N-Cont.	18	27.8	0.0	0.0	0.0	72.2
00-G-Cont.	26	15.4	0.0	0.0	0.0	84.6
01-G-Cont.	36	19.4	0.0	0.0	0.0	80.6
02-G-Cont.	8	12.5	0.0	12.5	0.0	75.0
00-従来法	27	100	0.0	0.0	0.0	0.0
01-従来法	39	100	0.0	0.0	0.0	0.0
02-従来法	16	56.3	0.0	37.5	0.0	6.3
00-循環法	30	100	0.0	0.0	0.0	0.0
00-MT100-(75:105)-2d	27	88.9	0.0	3.7	0.0	7.4
00-MT100-(75:125)-2d	25	24.0	4.0	0.0	0.0	72.0
00-MT100-(75:145)-2d	25	32.0	0.0	0.0	0.0	68.0
00-MT100-(75:165)-2d	24	20.8	0.0	54.2	0.0	25.0
00-MT 10-(75:105)-2d	29	96.6	0.0	0.0	0.0	3.4
00-MT 10-(75:125)-2d	28	100	0.0	0.0	0.0	0.0
00-MT 10-(75:145)-2d	29	100	0.0	0.0	0.0	0.0
00-MT 10-(75:165)-2d	31	93.5	0.0	0.0	0.0	6.5
01-MT 10-(78:152)-2d	40	100	0.0	0.0	0.0	0.0
01-MT 10-(78:152)-4d	40	100	0.0	0.0	0.0	0.0
01-MT 10-(78:152)-6d	39	100	0.0	0.0	0.0	0.0
01-MT 10-(94:152)-2d	39	87.2	0.0	7.7	0.0	5.1
01-MT 10-(106:152)-2d	37	13.5	0.0	0.0	0.0	86.5
01-MT 5-(78:152)-2d	36	100	0.0	0.0	0.0	0.0
02-MT 10-(73:148)-2d	7	71.4	0.0	28.6	0.0	0.0
02-MT 5-(73:148)-2d	41	53.7	0.0	34.1	12.2	0.0
02-MT 5-(66:148)-2d	12	41.7	0.0	8.3	41.7	8.3
02-MT 5-(66:108)-2d	4	100	0.0	0.0	0.0	0.0
02-MT 5-(66:86)-2d	6	50.0	0.0	16.7	33.3	0.0
02-MT 5-(80:86)-2d	16	43.8	0.0	43.8	0.0	12.5
02-MT 5-(73:79)-2d	18	44.4	0.0	44.4	5.6	5.6
02-MT 5-(66:72)-2d	9	33.3	0.0	11.1	44.4	11.1

結果および考察

性比が大きく雄に偏る試験区が多く見られた。MTを経口投与することなくMT溶液への浸漬のみでも性転換雄魚が得られた。

試験は3カ年に分けて実施した。供試魚は年度ごとに異なり、各年度の対照区（全雌無処置群）における雌雄出現率にも僅かながら差が認められている。供試魚ならびに実験条件が年度間で完全には一致しないと考えられることから、実施年度の異なる試験区を直接比較することは厳密には適当でない。そこで、ふ化から浮上後約40日までMT濃度10 $\mu\text{g}/\ell$ 液に2日に1回の頻度で3時間浸漬する基準区を毎年設け、比較時の参考とした。この基準区は2000年処理群、2001年処理群ともに100%の雄性化率を示した。2002年処理群については調査中であるが、2003年3月時点で明らかな卵巣を持った個体は出現していない。

まず、MT浸漬処理の開始時期について検討した。受精後106日（浮上期）からの処理開始では雌の比率

が非常に高くなった。この時期は既に生殖腺が卵巣に分化し、外部から雄性ホルモンを与えても精巣には転化できないものと推定された。ヒメマスの場合、浮上後に開始される経口投与方法では雄性化が困難であることが知られている。今回の試験結果は浮上期からのMT処理では雄への誘導が難しいことを裏付けるものとなった。

一方、浸漬処理を受精後75ないし78日から開始した試験区では、雄の比率がきわめて高かった。受精後75ないし78日はふ化期であり、ふ化から浸漬処理を開始すれば十分に雄を誘導できることが示された。

浸漬処理をふ化からいつまで継続する必要があるかという点については、2002年に設定した試験区の結果を得る必要がある。2003年3月時点では未だ生殖腺の発達が不十分であり、雌雄を判別できない個体が多かった。供試魚は現在も継続飼育しており、今後、性比を精査していく予定である。

次に、2001年に設定した試験において、雄性化に必要な浸漬処理の頻度を検討した。2日に1回、4日に1回、6日に1回のいずれの処理頻度においても100%の雄性化率が得られた。浸漬液のMT濃度が10 $\mu\text{g}/\ell$ である場合、6日に1回の3時間浸漬処理で十分に雄を導くことができた。

さらに、3種類の浸漬液MT濃度（100 $\mu\text{g}/\ell$ 、10 $\mu\text{g}/\ell$ 、5 $\mu\text{g}/\ell$ ）について比較した。10 $\mu\text{g}/\ell$ における雄性化率はきわめて高かった。これに対し100 $\mu\text{g}/\ell$ では、雌が多く出現した。最も処理期間が短い（30日間）試験区での雌出現率は7%程度であったが、処理期間が50日、70日と延長されると雌の出現割合は70%前後に増加した。さらに長い90日間の処理では、性別の判断できない生殖腺を持つ個体が過半数を占めた。体サイズや年齢から判断し、これらの個体は不稔となったものと考えられた。これらのことから、MT処理が過度になると雄性化率が低下し、さらに強い処理に曝されると不稔化するものと推測された。

MT濃度5 $\mu\text{g}/\ell$ でふ化から浮上後40日まで浸漬処理を行ったところ、10 $\mu\text{g}/\ell$ と同じく、検査個体はすべて雄だった（2001年処理群）。2002年に同じ処理条件の試験区を設けており、今後、その生殖腺を観察し、再現性を確認していく予定である。なお、2003年3月現在、この試験区に明らかな卵巣を持つ個体は確認されていない。

[試験2] 高温処理による雄性化

ホルモン剤に依存しない雄性化技術の開発を目的に、

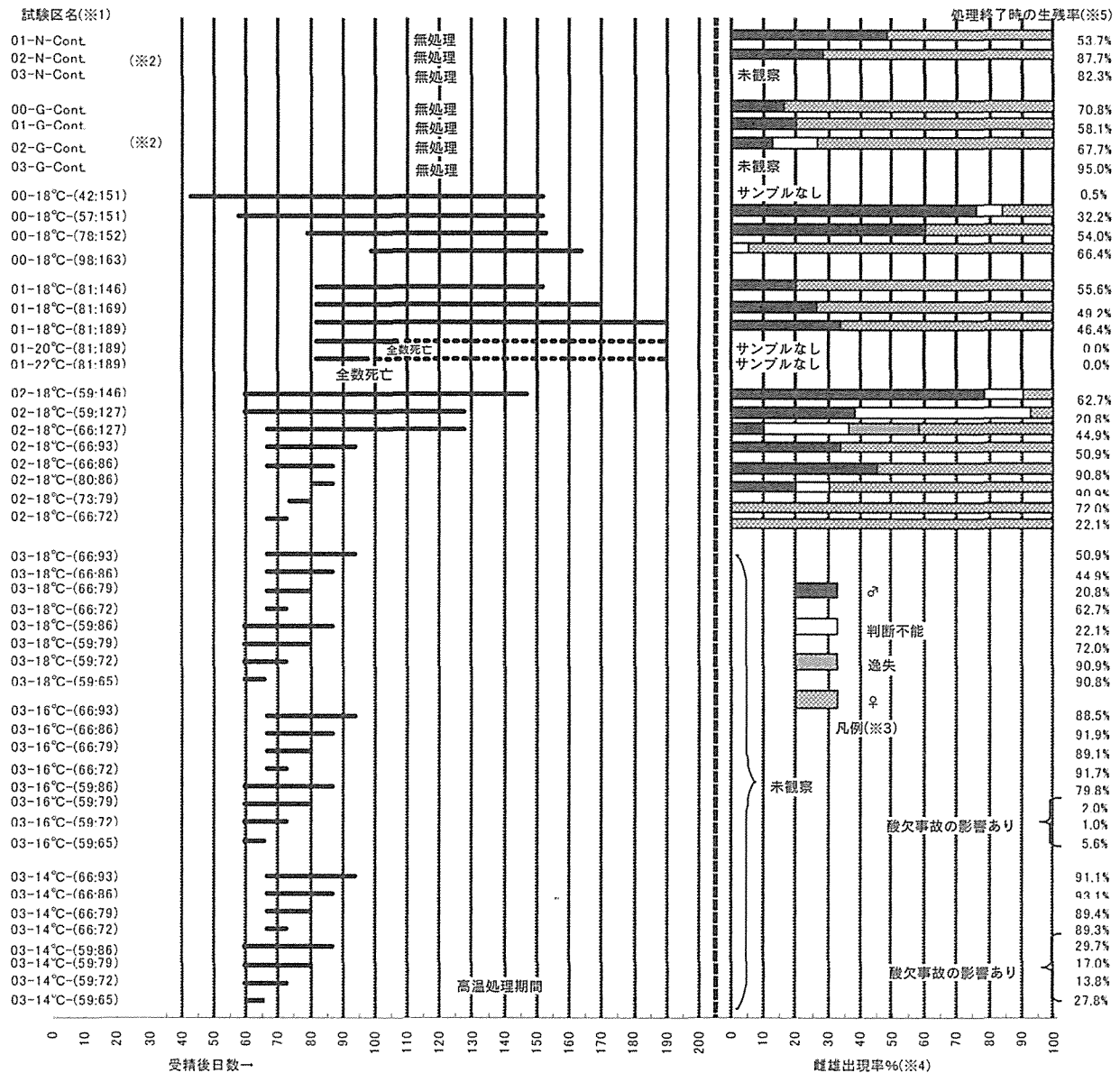


図2 高温処理の方法と処理結果 (2003年3月現在)

- ※1 先頭の数字は処理年度(西暦)、温度は処理水温、続く()内の数値は処理期間(受精後〇日～〇日まで)を表す。
- ※2 N-Cont.は高温処理を行わなかった通常受精群(雌雄混合群)、G-Cont.は高温処理を行わなかった全雌群。
- ※3 「判断不能」とは雌雄の区別ができなかったもの、「逸失」とは組織標本を作成する過程で生殖腺を見失ったものを指す。
- ※4 2000年度及び2001年度処理群の値は成熟期に採集した個体の観察結果、2002年度処理群は生殖腺の発達が進んでいない段階での組織標本観察結果を記載。
- ※5 2000年度処理群は受精後177日、2001年度処理群は受精後163日、2002年度処理群は受精後181日、2003年度処理群は受精後189日の生残率を示す。

前年度に引き続き、卵・稚仔への高温処理が性決定に与える影響を検討した。

試験区設定 高温処理によるヒメマス性転換雄魚作出条件を探るため、処理期間、処理水温について表3、図2のとおり試験区を設定した。なお、設定水温への馴致は1日に3℃ずつを原則に行った。

対照については前述のMT処理試験と同じとした。

なお、2003年設定区では、受精後59日目からの処理を開始とした14℃区、16℃区において、試験装置の不具合から、ふ化時に酸欠事故が発生し、生残率が著しく低くなった。

結 果

性比が雄に偏る試験区が一部に見られた。ホルモン

表3 高温処理を行った供試魚の性比

試験区名	検査尾数	性比 (%)				
		♂	間性	判断不能	逸失	♀
01-N-Cont.	38	47.4	0.0	0.0	0.0	52.6
02-N-Cont.	18	27.8	0.0	0.0	0.0	72.2
00-G-Cont.	26	15.4	0.0	0.0	0.0	84.6
01-G-Cont.	36	19.4	0.0	0.0	0.0	80.6
02-G-Cont.	8	12.5	0.0	12.5	0.0	75.0
00-18°C-(57:151)	12	75.0	0.0	8.3	0.0	16.7
00-18°C-(78:152)	22	59.1	0.0	0.0	0.0	40.9
00-18°C-(98:163)	29	0.0	0.0	3.4	0.0	96.6
01-18°C-(81:146)	36	19.4	0.0	0.0	0.0	80.6
01-18°C-(81:169)	35	25.7	0.0	0.0	0.0	74.3
01-18°C-(81:189)	33	33.3	0.0	0.0	0.0	66.7
02-18°C-(59:146)	9	77.8	0.0	11.1	0.0	11.1
02-18°C-(59:127)	13	38.5	0.0	53.8	7.7	0.0
02-18°C-(66:127)	19	10.5	0.0	26.3	21.1	42.1
02-18°C-(66:93)	6	33.3	0.0	0.0	0.0	66.7
02-18°C-(66:86)	11	45.5	0.0	0.0	0.0	54.5
02-18°C-(80:86)	10	20.0	0.0	10.0	0.0	70.0
02-18°C-(73:79)	13	0.0	0.0	0.0	0.0	100
02-18°C-(66:72)	10	0.0	0.0	0.0	0.0	100

剤を一切使用せずに、飼育水温の制御のみでも性転換雄魚が得られた。

試験は4カ年に分けて実施しており、各試験区の供試魚は年度ごとに異なる。このため、前述のMT浸漬法についての試験と同様に、すべての試験区を同列で比較することは厳密には適当でない。しかし、一定の傾向は捉えられるものと考え、総合的に考察を行った。

最初に生残率の観点から高温処理の開始期について検討した。試験区の中で最も早い受精後42日（発眼後12日）からの処理開始区（18°C）では、ふ化までの死亡数が多かった。ふ化終了時の生残率は20%以下であった。さらに浮上期にも再び死亡率が高くなり、処理終了時の生残率は0.5%ときわめて低くなった。発眼後12日からの18°C処理はヒメマス卵稚仔の生存限界を超えており、処理開始期として不適であると考えられた。

受精後57日（発眼後27日）以降から18°Cとした試験区でも、ふ化時や浮上時に死亡する個体が多かったが、処理終了時の生残率は20%以上となり、上述の試験区と比べるとやや高かった。受精後80日前後からの処理開始では、さらに生残率の向上が認められた。

次に、雄出現率の観点から処理開始期を検討した。受精後98日（浮上期）からの高温処理開始では、雄個体はまったく現れなかった。MT浸漬法の試験でも、浮上期からの処理で雄はほとんど得られておらず、高温処理においてもこの時期からの処理開始では遅いこ

とが明らかとなった。

これに対し、受精後57日から151日までの18°C処理では雄出現率が75%と非常に高かった。2002年に設定した上記とほぼ同じ処理条件の試験区（受精後59日から146日まで18°C処理）においても、参考値ながら雄出現率77.8%が観察された。2002年設定群については、今後、性比を精査する必要があるが、高温処理によるヒメマスの性転換雄魚作出において、本処理条件は安定性のある処理条件であると考えられた。

一方、本処理条件より約3週間遅い受精後78~81日目（ふ化期）からの処理開始では、雄の出現は見られなかったものの、その割合は低下した。また、未確定の値ではあるが、安定性の得られた処理条件より約1週間遅い受精後66日からの処理開始区（2002年実施）においても、雄の出現率がやや低い傾向が見られた。いずれも、処理期間の延長により雄出現率が上昇する傾向は明確ではなく、むしろ処理開始の早遅と雄出現率の高低に強い関係が見られる傾向にあった。

受精後59日、66日はいずれもふ化前である。前述のMT浸漬法に関する試験では、ふ化から処理を開始しても性転換雄魚を高率で得ることができたが、高温処理法ではふ化前からの、しかも早い段階での処理開始が不可欠である可能性が示唆された。

今後、2002年処理区と2003年処理区の性比を観察し、雄性化率及び生残率の高い性転換雄魚作出条件を調査する予定である。

次に、雄性化に必要な水温条件を検討した。14°Cから22°Cまで2°Cごとに5試験区を設定した。このうち、20°C区及び22°C区では処理期間中に供試魚が全数死亡した。このことから、20°C以上はヒメマス稚仔の生存限界を超える水温であり、処理水温として不適であることが明らかになった。

18°Cでは性転換雄魚が得られたが、16°C、14°Cについては今後の生殖腺発達を待ち、その後に観察を行う予定である。

〔試験3〕低pH、高pH処理による雄性化

ホルモン剤に依存しない雄性化技術の開発を目的に、前年度に引き続き、卵・稚仔へのpH処理が性決定に与える影響を検討した。

試験区設定 pH処理によるヒメマス性転換雄魚作出条件を探るため、処理期間、処理pHについて表4、図3のとおり試験区を設定した。なお、設定pHへの馴致は1日1ずつの上昇ないし降下を原則に行った。

pHの上昇・降下・維持は、pHコントローラに接続

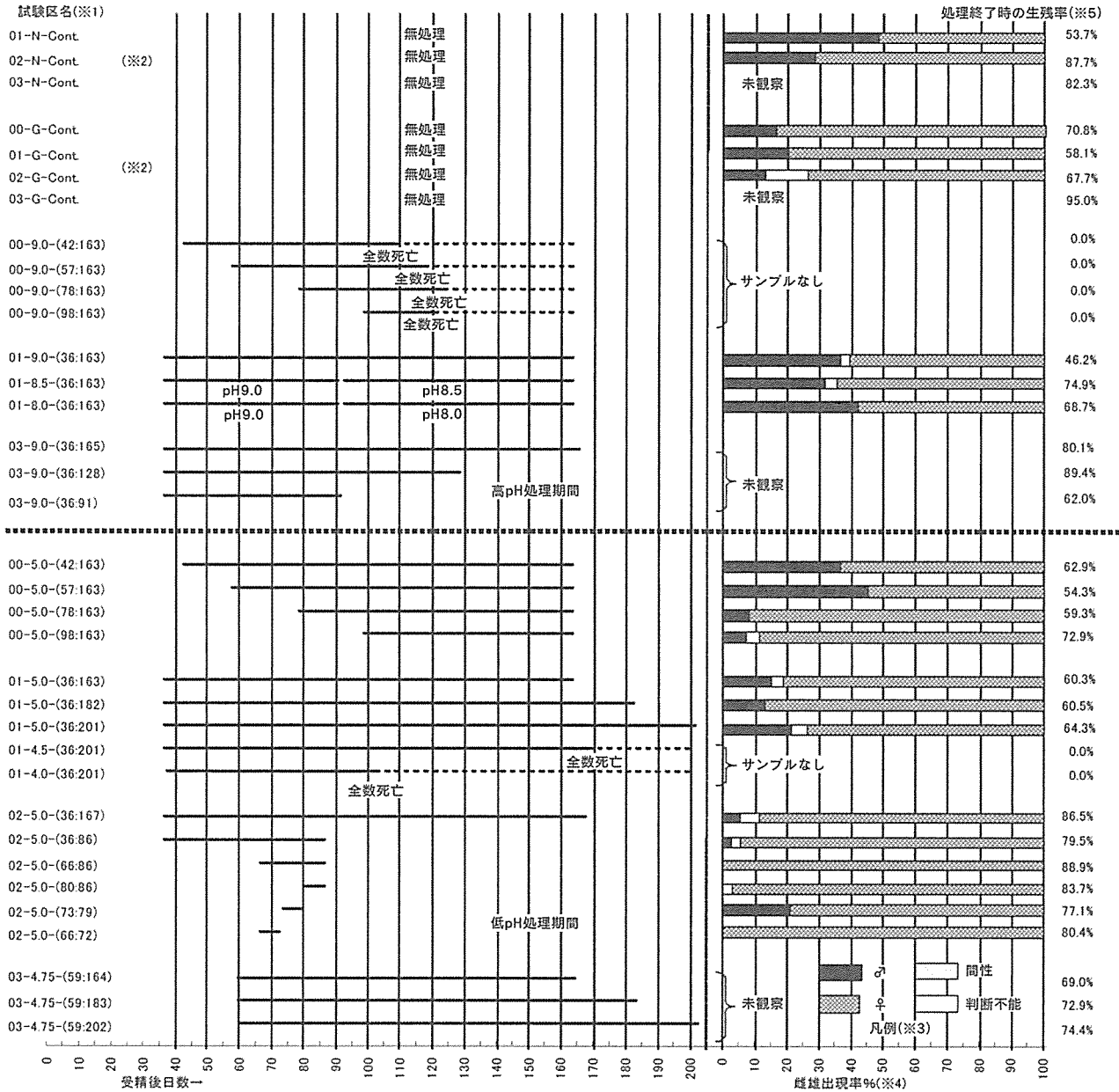


図3 pH処理の方法と処理結果 (2003年3月現在)

- ※1 先頭の数字は処理年度(西暦)、続く数字は処理pH、()内の数値は処理期間(受精後○日～○日まで)を表す。
- ※2 N-Cont.はpH処理を行わなかった通常受精群(雌雄混合群)、G-Cont.はpH処理を行わなかった全雌群。
- ※3 「判断不能」とは雌雄の区別ができなかったもの、「逸失」とは組織標本を作成する過程で生殖腺を見失ったものを指す。
- ※4 2000年度及び2001年度処理群の値は成熟期に採集した個体の観察結果、2002年度処理群は生殖腺の発達が進んでいない段階での組織標本観察結果を記載。
- ※5 2000年度処理群は受精後177日、2001年度処理群は受精後163日、2002年度処理群は受精後181日、2003年度処理群は受精後189日の生残率を示す。

したペリスタポンプにより、2N-NaOHあるいは2N-H₂SO₄を循環飼育水槽中に滴下する方法によった。また、水質を良好に維持するため、常時少量の飼育水を注水した。飼育用水(水温約9℃)をかけた大型容器を恒温水槽とし、pH値を調整した循環水槽を

この中に設置した。これにより各区の水温条件を極力同一となるようにした。

対照については前述のMT処理試験と同じとした。

表4 pH処理を行った供試魚の性比

試験区名	検査尾数	性比 (%)				
		♂	間性	判断不能	逸失	♀
01-N-Cont.	38	47.4	0.0	0.0	0.0	52.6
02-N-Cont.	18	27.8	0.0	0.0	0.0	72.2
00-G-Cont.	26	15.4	0.0	0.0	0.0	84.6
01-G-Cont.	36	19.4	0.0	0.0	0.0	80.6
02-G-Cont.	8	12.5	0.0	12.5	0.0	75.0
01-9.0-(36:163)	39	35.9	0.0	2.6	0.0	61.5
01-8.5-(36:163)	38	31.6	2.6	0.0	0.0	65.8
01-8.0-(36:163)	39	41.0	0.0	0.0	0.0	59.0
00-5.0-(42:163)	20	35.0	0.0	0.0	0.0	65.0
00-5.0-(57:163)	28	17.9	0.0	0.0	0.0	82.1
00-5.0-(78:163)	26	7.7	0.0	0.0	0.0	92.3
00-5.0-(98:163)	28	7.1	0.0	3.6	0.0	89.3
01-5.0-(36:163)	41	14.6	0.0	2.4	0.0	82.9
01-5.0-(36:182)	39	12.8	0.0	0.0	0.0	87.2
01-5.0-(36:201)	40	20.0	0.0	5.0	0.0	75.0
02-5.0-(36:167)	36	5.6	0.0	5.6	0.0	88.9
02-5.0-(36: 86)	39	2.6	0.0	2.6	0.0	94.9
02-5.0-(66: 86)	36	0.0	0.0	0.0	0.0	100
02-5.0-(80: 86)	36	0.0	0.0	2.8	0.0	97.2
02-5.0-(73: 79)	15	13.3	0.0	0.0	0.0	86.7
02-5.0-(66: 72)	11	0.0	0.0	0.0	0.0	100

結 果

低pH、高pHともに、一部の試験区で雄が出現した。ホルモン剤を一切使用せずに、飼育水のpH制御のみによっても性転換雄魚が得られた。しかし、その出現割合はMT浸漬法、高温処理法に比べ低かった。

前述のMT浸漬法、高温処理法に関する試験と同様に、各試験区の供試魚は年度ごとに異なっている。すべての試験区を同列で比較することは厳密には適当でないが、一定の傾向は捉えられるものと考え、総合的に考察を行った。

まず、適正なpH強度について検討した。低pHについては5.0、4.75、4.5、4.0の4段階を試験した。低pH処理では総じてふ化が遅れる傾向が認められた。対照区では受精後80日以前にふ化が終了したが、pH5.0区、pH4.75区でのふ化終了はこれより約3週間遅延した。pH4.5区でのふ化終了は受精後152日とさらに遅れた。pH4.5区では受精後84日目頃から死亡率が急激に高くなり、受精後170日目にはすべて死亡した。さらにpH4.0区でもほぼ同時期から死亡率が急上昇し、ふ化稚魚を見ることなく、受精後103日には全数が死亡した。これらのことから、ヒメマス卵・稚仔の低pH側生存限界はpH4.5~4.75の間と推測され、pH4.5以下の処理は不適當であることがわかった。

pH強度が雄性化率にどの程度影響を及ぼしている

かについては、2003年に処理を行ったpH4.75区の生殖腺分化状況を調査後に検討する予定である。

次に高pHについてpH9.0を中心に検討を行った。pH9.0区は3カ年にわたり設置したが、処理終了時の生残率に再現性が得られなかった。2000年に実施した試験では、処理開始期の早遅に関わらず全数が死亡した。これに対し、2001年の試験では受精後36日から128日間にわたり卵・稚仔をpH9.0に曝露したが46.2%の生残率が得られた。ほぼ同一の条件で2003年に実施した試験区では、さらに高い80.1%の生残率が認められた。年により生残率が著しく異なった原因については不明である。ただし、今回使用したpHコントローラとペリスタポンプの組み合わせによるpH維持装置では、設定値が常時維持されているわけではない。実際には設定値を中心にpH値が上下変動する状況にあった。試験水槽には水質劣化を防止する目的で飼育水を少量ずつ注水したが、この注水量を各年で統一しなかった。これにより、pHが設定値より高く振れた時の値、またそのpHの継続時間などが各年で異なり、生残率に影響を与えた可能性も否定できない。

いずれにしても、生残率が0となった例もあったことから、高pH処理の強度はpH9.0以下とすることが適当と考えられた。

pH強度と雄性化率の関係については、2001年にpH9.0、8.5、8.0の3段階で比較した。ただし、受精後36日から91日まで（8週間）は各試験区ともpH9.0への曝露とし、92日目以降163日まで、それぞれの設定pHへの曝露に変更したものである。

3試験区ともに30から40%程度の雄性化率を示し、曝露されたpHと雄性化率の間に特定の関係は認められなかった。前述のMT浸漬法、高温処理法において、浮上期からの処理が雄性化に無効であることが示されている。3つの異なる高pHについての試験では、共通の処理となった浮上期直前までのpH9.0処理が性比に反映され、その後に変更されたpHは結果に影響を及ぼさなかった可能性が高い。

pH処理の開始時期に関しては、低pH処理においてMT浸漬法、高温処理法と同様の結果が得られた。すなわち、受精後78日目、98日目からの処理開始で得られた性転換雄魚は10%以下だった。これに対し、受精後42日目、57日目からの処理開始では、前者よりやや多い40%前後の雄が出現した。

処理期間の延長による雄性化率の向上については、2001年にpH5.0で検討した。処理期間を最大で受精後201日まで延長したが、雄性化率向上への明確な効果

は認められなかった。2003年にはpH4.75及びpH9.0で同様の試験を実施しており、今後、生殖腺の状況を調査する予定である。

高pH、低pHともに、現段階では高温処理に比べ雄性化率が劣っている。また、pHの維持装置は水温維持装置より複雑であり、かつ安定した値を維持することが難しい。これらのことから、ホルモン剤に依存しない雄性化の手法としては、pH処理よりも高温処理の方が優れていると考えられた。

ところで、配置した対照区（全雌群）に毎年10から20%程度の雄が出現した。この原因として、対照区に他区あるいは外部から雄が混入した可能性、当初から対照群に雄が存在していた可能性、無処理にもかかわらず一部の供試魚に雄性化が起きた可能性が考えられた。本試験の試験区から2002年に得られた成熟雄を媒精に使用し、得られた次世代の生殖腺を受精後約1年に観察した（表5）。

対照区に出現した2尾の雄から得た次世代では、明確に卵巣と判断された個体の割合が75%であった。生残率が低く検査尾数が少なくなったため結論は得がたい。しかしこの数値は、計算上ではあるが、出現した雄の1尾が性転換雄魚、1尾が通常の雄であった場合の期待値と一致する。同様に他区においても、従来法及び18℃（57:151）では6尾中1尾が、pH5.0（42:163）では6尾中2尾が、pH5.0（57:163）では5尾中2尾が、pH5.0（78:163）では1尾中1尾が通常雄であった場合の期待値に近い観察値となっている。これらのことから、2000年に作出した供試魚には当初から雄が僅かに混入していた可能性が疑われる。

しかしながら、この場合、供試魚全体が雄を含む群となるはずであるが、一方で雄がまったく出現しない

試験区が2000年及び2002年に見られている。また、ヒメマス性転換雄魚を用いて得た次世代で、雄が10%程度出現する例が北海道立水産ふ化場から報告されている。今回の本試験において、この報告と同様の現象が起きた可能性も考慮する必要がある。

上述した3つの可能性はすべて捨てきれない。対照区に雄が出現したため、雄性化処理それぞれの効果についての解析が難しくなったが、対照区の雄出現率と比較しても十分に高い出現率を示す試験区が見られている。したがって、MT浸漬、高温処理、pH処理いずれの手法によっても雄が誘導されたことは明らかであると推察された。

（ヒメマス性転換技術改善プロジェクト）

表5 試験区に出現した雄親魚と通常雌との媒精により得られた次世代の性 単位：%

雄親魚の由来する試験区	媒精した雄親魚数	検査尾数	♀	判断不能
00-G-Cont.	2	12	75.0	25.0
00-従来法	6	60	91.7	8.3
00-循環法	6	7	100	0.0
00-18℃-(57:151)	6	60	90.0	10.0
00-18℃-(78:152)	6	10	100	0.0
00-5.0-(42:163)	6	46	84.8	15.2
00-5.0-(57:163)	5	34	82.8	17.2
00-5.0-(78:163)	1	34	58.8	41.2
通常♂	3	47	57.4	42.6

※ 通常♂は養殖研究所日光支所のヒメマス継代飼育群から得た成熟雄である。