

全雌ニジイワ3N生産のためのイワナ性転換雄の作出

服部克也・中村総之・落合真哉

Induction of sex-reversed male Japanese char for all-female allotriploid production

HATTORI Katsuya*¹・NAKAMURA Fusayuki*² and OCHIAI Masaya*²

Abstract

Histological sections of the gonads of 36-50 days after hatching Japanese char, *Salvelinus leucomaenis*, showed the presence of cysts characterizing morphological ovary differentiation. Thus, similarly to other salmonids, the sex differentiation in Japanese char seems to occur at the swim-up stage (around 36-50 days after hatching). Sex-reversed male experiments were conducted through the application of 17 α -methyltestosterone (MT) into the water from the hatching to the swim-up stage and by oral administration during the subsequent 60 days. The highest percentage (15%) of sex-reversed male was obtained by dosages of 0.5 μ g MT/l of water/2 hours/2 days during the immersion treatment and 0.5 mg MT/kg diet for the oral administration treatment. The gonado-somatic indexes of the allotriploids induced by using female houraimasu, *Oncorhynchus mykiss*, and sex-reversed male Japanese char presented low values (inferior to 0.045) during the spawning season, thus indicating that those allotriploids were female. Therefore, this study suggested that is possible to culture all-female allotriploid using sex-reversed male Japanese char.

キーワード；イワナ，生殖腺性分化時期，雄性ホルモン処理，性転換雄，全雌ニジイワ3N

はじめに

ホウライマス（無斑ニジマス）, *Oncorhynchus mykiss* はパーマークおよび黒点が全く出現しないことから、野生型のニジマス, *O. mykiss* とは外観から明瞭に識別することができる。このホウライマスの無斑形質を利用して無斑異質三倍体魚¹⁻³⁾を作出し、これらを地域特産品種とすることが試みられている。このうち、ニジアマ3N（ホウライマス雌とアマゴ, *O. rhodurus* 雄との異質三倍体魚）およびニジイワ3N（ホウライマス雌とイワナ, *Salvelinus leucomaenis* 雄との異質三倍体魚）では、雌は不妊⁴⁾となり、成熟による成長遅滞やサビの出現もなく、食品としての品質劣化が避けられるという利点が挙げられる。しかし、雄は二次性徴を示し、生殖腺も発達する⁴⁾ため食品としての価値が低下する。また、雄は配偶子の形成が行われるため、自然環境下における在

来種の特長への影響が懸念される。このため、これら異質三倍体魚については、養殖魚として利用する場合には不妊化する全雌化が求められている。ニジアマ3Nについては、既にアマゴ性転換雄⁵⁾を用いた全雌化が可能となっているが、ニジイワ3Nについては、イワナ性転換雄の作出技術が確立されていないため全雌化に至っておらず、早急に性転換雄の作出技術を確立することが望まれている。このため本試験では、イワナの生殖腺の性分化時期の推定、性転換雄の作出および性転換雄を用いた全雌ニジイワ3Nの作出について検討を行った。なお、性転換雄の作出方法としては、ニジマス⁶⁾では雄性ホルモン（17 α -Methyltestosterone, 以下MT）の経口投与、マスノスケ, *O. tshawytscha*,⁷⁾ ギンザケ, *O. kisutch*⁸⁾では浸漬処理、アマゴ⁵⁾では浸漬処理と経口投与の組合せが用いられている。本試験では、イワナの性分化時期およびMTによる適正処理方法が不明であるため、MT処理の期間が長く、生殖腺がMTの影響を受

* 1 愛知県水産試験場 漁業生産研究所

(Marine Resources Research Center, Aichi Fisheries Research Institute, Minamichita, Aichi 470-34, Japan)

* 2 愛知県水産試験場 内水面漁業研究所 三河一宮指導所

(Mikawa-Ichinomiya Station, Fresh-water Resources Research Center, Aichi Fisheries Research Institute, Hoi Aichi 441-19, Japan)

け易いと推定される浸漬処理と経口投与の組合せを用いた。

材料および方法

生殖腺の性分化時期の推定

供試魚として鳳来養魚場（現、三河一宮指導所）で飼育されているイワナを用いた。通常交配した1腹から得られたイワナふ化仔魚を、ふ化後2日目から50日目まで7日間隔で数尾をBouin液で固定した。固定時にはふ化仔魚の卵黄を針先で潰して吸水紙により吸い出した。これらサンプルを組織標本として、Hematoxylin-Eosin染色を行い、顕微鏡下で生殖腺を観察した。ふ化、飼育には湧水を用いたが、その水温は $11 \pm 1.5^\circ\text{C}$ であった。供試魚への給餌は行わなかった。

性転換雄作出条件の検討

性転換雄の作出試験にはイワナ雌性発生二倍体魚を用いたが、これらは鳳来養魚場で飼育されているイワナ雌およびニジマス雄の10年魚から作出した。雌性発生にニジマス雄を用いたのは、ニジマス雄とイワナ雌との組み合わせでは、雑種二倍体魚⁹⁾ および異質三倍体魚¹⁰⁾の生存性が極めて低いことから、精子の遺伝的不活性化が不十分であった場合においても、雌性発生二倍体のみが生存し、雌性発生の確認が可能であることによる。遺伝子不活性化精子は、ニジマス精液を人工精漿(pH 8)¹¹⁾で100倍に希釈し、これに $6,000\text{erg}/\text{mm}^2$ の紫外線を照

射して作成した。このニジマス遺伝子不活性化精子と常法により採卵されたイワナ卵を0.85%食塩水中で1~2分間媒精し、その後飼育水（水温 $11.5 \sim 12.5^\circ\text{C}$ ）にて卵を吸水させた。吸水10分後に卵を 26°C の温水に20分間浸漬する温度処理を行い、第2成熟分裂を阻止して雌性発生を誘起した。温度処理後、卵は通常のふ化管理（ふ化用水の水温 $11 \pm 1.5^\circ\text{C}$ ）を行ったが、発眼卵の選別は積算水温で約 $300 \sim 350^\circ\text{C} \cdot \text{日}$ に行い、選別された発眼卵はMTの処理試験区別に金ザルに収容し、暗所、流水下で浮上まで管理した。

MTの処理試験区は15区設定したが、各区の浸漬処理でのMT溶液濃度、処理間隔、処理期間、経口投与でのMT飼料添加濃度および投与期間はTable 1に示した。12区~15区については、MT経口投与濃度の雄化への影響を比較するため、浸漬処理終了後に4区~11区の試験魚の一部を混合し、試験区とした。なお、1区~3区では計5回（作出日の前後間隔は10日）の雌性発生により得られた卵（収容発眼卵数400粒/区）をプールして用いたが、雌性発生にはイワナ雌親魚53尾（平均体重 $700 \pm 100\text{g}$ ）およびニジマス雄親魚5尾（ $767 \pm 133\text{g}$ ）を使用した。また、4区~15区では計5回（作出日の前後間隔は14日）の雌性発生により得られた卵（収容発眼卵数700粒/区）をプールして用いたが、雌性発生にはイワナ雌親魚73尾（ $679 \pm 69\text{g}$ ）およびニジマス雄親魚5尾（ $850 \pm 115\text{g}$ ）を使用した。

MTの浸漬処理は、ふ化が収容卵の約60%程度観察された時点から、ふ化仔魚の約80%以上が浮上し、餌付で

Table 1. The dosage of 17 α -methyltestosterone (MT), intervals and durations in the immersion treatment, and the dose of MT and durations in the oral administration treatment for the sex-reversed Japanese char induction

Experiment No.	Dosage of MT in the immersion treatment ($\mu\text{g}/\ell$ water)	Interval of the immersion treatment (days, for 2 hours)	Duration of the immersion treatment (days after hatching)	Dose of MT in the diet (mg/kg diet)	Duration of the oral administration (days after hatching)
1	100	7	0-35	1	27-86
2	10	5	0-35	1	27-86
3	10	2	0-38	1	27-86
4	1	2	0-32	0.5	31-90
5	1	4	0-32	0.5	31-90
6	0.5	2	0-32	0.5	31-90
7	0.5	4	0-32	0.5	31-90
8	0.1	2	0-32	0.5	31-90
9	0.1	4	0-30	0.5	31-90
10	1	7	2-30	0.5	31-90
11	10	10	0-30	0.5	31-90
12		No. 4 + No. 5		0.1	31-90
13		No. 6 + No. 7		0.1	31-90
14		No. 8 + No. 9		0.1	31-90
15		No. 10 + No. 11		0.1	31-90

きる時点まで行った。浸漬処理に用いたMT溶液は、エタノールに溶解したMTを5ℓの飼育水に添加して調整し、この溶液中に、金ザルに収容したふ化仔魚を通気しながら暗所で2時間浸漬した。浸漬処理終了後は金ザルに収容したまま、流水下でMT添加飼料による経口投与を60日間行った。MT添加飼料の投与量は見かけの飽食量とした。MT添加飼料は、エタノールに溶解したMTをマス用配合飼料と十分に混和し、その後エタノールを風乾により完全に蒸発させて作成した。MTの経口投与処理後、試験魚は小型コンテナ水槽に収容し、通常の飼育管理を行った。試験魚については、ふ化後12カ月齢と24カ月齢において生殖腺の外見的な観察を行い、雄雌の判定を行った。なお、1区～3区については、ふ化後12カ月齢に各区10尾の生殖腺組織標本の観察を行った。また、対照としてふ化後12カ月齢のイワナ通常二倍体の雄3尾について、生殖腺の組織標本の観察を行った。

全雌ニジイワ3Nの作出

12カ月齢の産卵期に、MT処理試験区の4区、5区および6区において二次性徴を呈した試験魚9尾(96±15g)の精巢を摘出し、これを人工精漿(pH9)¹¹⁾中で細切して精液を調整した。精子の運動性を確認後、この精液とホウライマス20尾(1086±115g)から常法により採卵された卵を0.85%食塩水中で1～2分間媒精し、その後、ポンプアップされた伏流水(水温18℃)を熱交換装置により12℃に冷却したふ化用水で吸水した。吸水10分後に卵を26℃の温水に20分間浸漬する温度処理を行い、第2成熟分裂を阻止して異質三倍体化した。卵は処理後、立体式ふ化槽に収容して卵管理およびふ化管理を行った。ふ化仔魚が浮上した時点で、水温18℃の飼育水を用いて餌付け、飼育管理を行った。なお、作出されたニジイワ3Nのうち30尾について浮上時に血液塗沫標本を作成し、赤血球長径により倍數化の確認¹⁾を行った。また、ニジイワ3Nの全雌化の確認を行うため、三河一宮指導所飼育ニジマスの産卵時期の12カ月齢、13カ月齢および14カ月齢に、30～50尾について生殖腺指数(GSI)の測定を行った。

結 果

生殖腺の性分化時期の推定

ふ化後8日目からふ化後50日目までに観察された生殖腺組織をFigs.1～6に示した。なお、ふ化後2日目のサンプルでは生殖細胞は観察できなかった。ふ化後8日目からふ化後36日目までのサンプルでは雄雌が確認できな

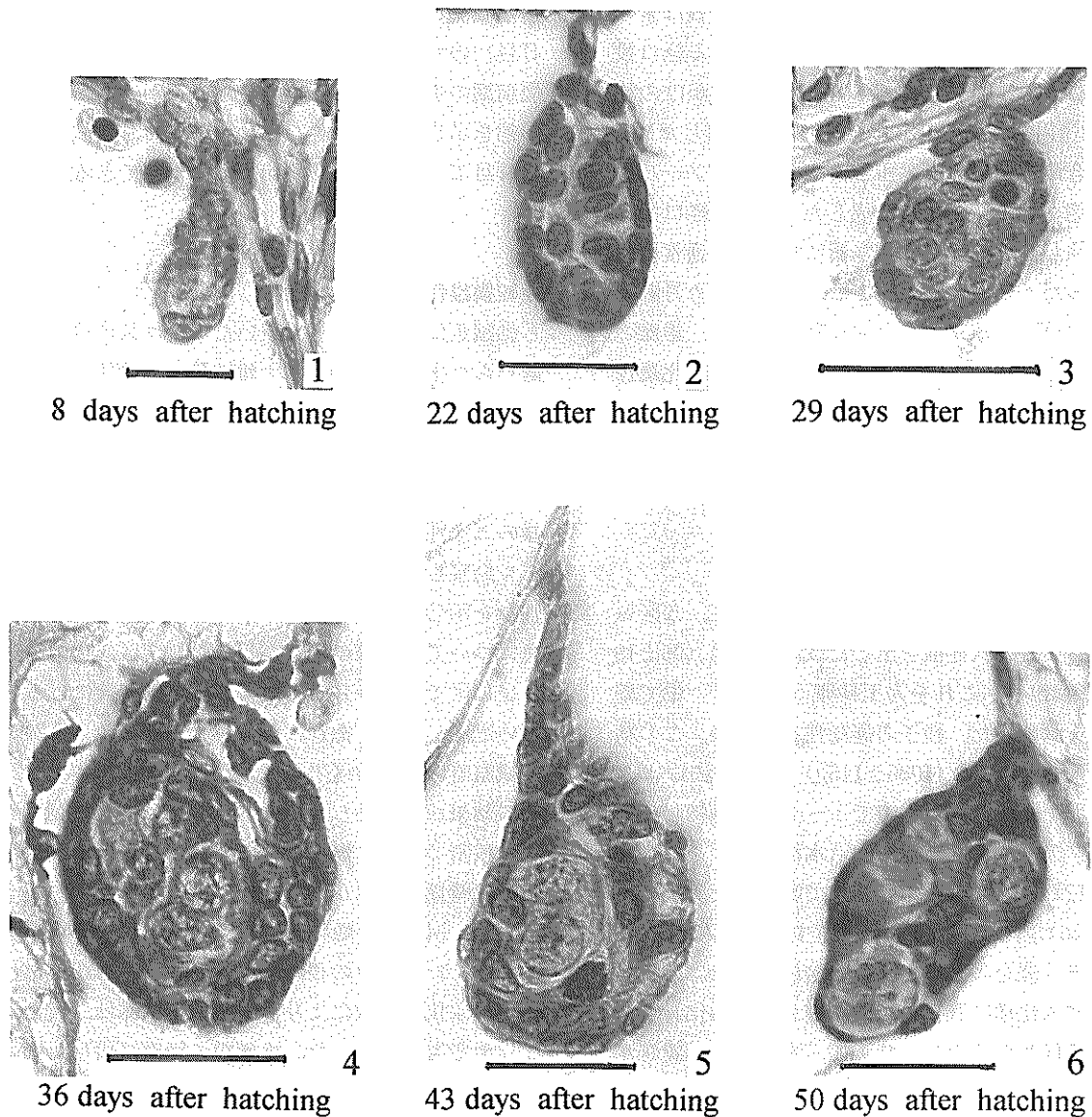
い生殖細胞が観察された(Figs.1～3)。ふ化後36日目にサンプルの一つ(Fig.4)に生殖細胞のシスト形成が観察され、ふ化後43日目(Fig.5)では多くのサンプルに生殖細胞のシスト形成が認められた。Fig.6(ふ化後50日目)のサンプルの生殖腺では、卵形成のための減数分裂前期の生殖細胞が認められたことから、初期の卵巢の形態を示していると見なされた。なお、供試魚はふ化後35日目ごろには浮上を開始し、餌付けできる状態にあった。

性転換雄作出条件の検討

供試魚には雄親として用いたニジマスの遺伝的影響は認められず、すべてイワナ雌性発生二倍体魚と考えられた。12カ月齢にすべての試験魚について外見的な形態観察を行い、その一部を生殖腺の観察に用いた。その後、1区～3区では生残魚のすべてについて、4区～12区では雄の二次性徴を呈していると思われた個体について継続して飼育した。なお、13区～15区では、12カ月齢に二次性徴を示した個体が少なかったことから、すべての試験魚について生殖腺の観察を行った。7区、10区、11区および12区では12カ月齢の観察後に腹鰭切除による標識を行い混養したが、擦れによる腹鰭の消失により24カ月齢の観察時には試験区の識別が不能となったので、24カ月齢の結果から除外した。なお、各区においてMT浸漬処理の段階で卵膜に傷が付いて死卵となる個体、ふ化後卵黄吸収時期に腹水が溜まりへい死に至る個体が多く認められた。MT浸漬処理後までに各区約40～60%の個体がへい死したが、その後のへい死はほとんど認められなかった。ふ化後腹水によりへい死する個体は、通常交配のイワナでも認められた。生殖腺の観察に供した個体は、各試験区ともに奇形魚、成長遅滞魚などを選別棄却した生残魚であった。

各処理試験区の生殖腺の組織標本(1区～3区のみ12カ月に実施)および肉眼(1区～3区は24カ月齢、4区～12区は12カ月齢および24カ月齢に実施)による観察結果をTable 2に示した。MT経口投与濃度が1mg/kg dietの1区～3区では、24カ月齢の観察で2区に1尾の成熟雄が見られたのみで、多くの個体の生殖腺は糸状を呈していた。組織観察ではこれらの生殖腺はセルトリ細胞様の組織が認められたが、生殖細胞を欠いた中空の構造であることから不妊化していることが確認された(Figs.7, 8)。イワナ通常雄の12カ月齢の生殖腺(Fig.9)では精子の形成が確認された。

MT経口投与濃度が0.5mg/kg dietの4区～11区については、MT浸漬処理濃度0.5～1μg/ℓの場合では、処



Figs.1-6 Cross sections through developing gonads in Japanese char.

Figs.1-3 show sexually indifferent gonads, Figs.4-5 show sexually indifferent forming definite some cysts. Fig. 6 shows a primary ovary. Rearing water temperature was $11 \pm 1.5^\circ\text{C}$. Bars represent $20 \mu\text{m}$ in Fig.1, $30 \mu\text{m}$ in Fig.2 and $50 \mu\text{m}$ in Figs.3-6.

理間隔が4日に1回に比べて2日に1回の処理試験区が雄の出現率が高い傾向にあり, MT浸漬処理濃度が $0.1 \mu\text{g}/\text{l}$ の場合では, 処理間隔に関係なく雄出現率は低い傾向にあった。また, 1区~3区で見られた糸状の生殖腺を持つ不妊個体が, 4区~11区では観察個体の15.9~46.2%出現しており, 11区が最も高い傾向にあった。

MT経口投与濃度が $0.1 \text{mg}/\text{kg}$ dietの12区~15区では, 12カ月齢での雄出現率は, 12~14区で同一MT浸漬

処理条件の試験区の12カ月齢の平均と比べて低い傾向にあり, 15区については, 若干高い傾向にあった。12区~15区では, 不妊個体が観察個体の3.8~12.0%出現したが, 4区~11区の結果に比べて低い傾向が認められた。

全雌ニジイワ3Nの作出

浮上時のニジイワ3Nの平均赤血球長径はすべての個体で $19\sim 20 \mu\text{m}$ であり, 判定基準とされるニジマス二倍

Table 2. Effects of 17 α -methyltestosterone treatments for the masculinization in Japanese char

Experiment No.	Masculinization rate	Sex distribution at month-old			Sex distribution at 24 month-old				Total
		Male	Female	Sterile	Male	Hemaphroditism	Female	Sterile	
1	0 %	—	—	10	0	0	10	33	53
2	2.0%	—	—	10	1	0	8	32	51
3	0 %	—	—	10	0	0	8	47	65
4	10.2%	7	11	36	7	3	100	3	167
5	4.5%	2	61	36	6	0	71	2	178
6	15.1%	11	45	54	11	6	57	2	186
7	(0.7%)	1	113	37	※	※	※	※	(151)
8	(1.9%)	3	118	37	—	—	—	—	158
9	(0 %)	0	116	22	—	—	—	—	138
10	(0 %)	0	106	24	※	※	※	※	(134)
11	(1.3%)	2	82	72	※	※	※	※	(156)
12	(3.0%)	4	113	16	※	※	※	※	(133)
13	(3.2%)	6	165	14	—	—	—	—	185
14	(1.3%)	2	151	6	—	—	—	—	159
15	(3.1%)	5	141	17	—	—	—	—	163

(), Data at 12 month-old

※, Data at 24 month-old(16 males/91 individuals mixed with No.10, No.11 and No.12)

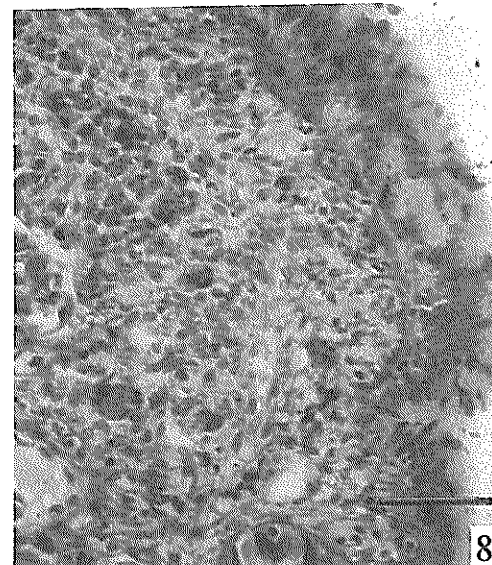
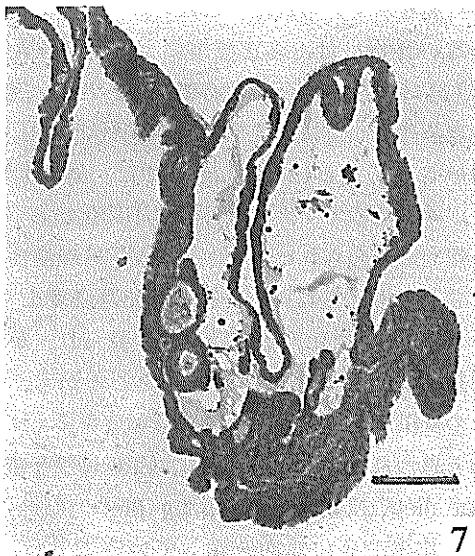
**Figs.7 and 8** Cross section of sex unknown gonad by 17 α -methyltestosterone treatment (experiment No.2) in 12 month-old Japanese char.

Fig.7 show a vacuity in the gonad (bar represent 200 μ m) , and Fig.8 shows germ cells like Sertoli's cell with no spermatogonium (bar represent 50 μ m) .



Fig.9 Cross section of normal testis with spermatozoa in 12 month-old Japanese char male (bar represent 100 μm).

Table 3. Age (month-old), number, mean body weight, and mean gonado-somatic index (GSI, gonad weight \times 100/body weight) of allotriploids from female houraimasu and sex-reversed male Japanese char

Age (month-old)	Number	Mean body weight (g)	Mean GSI (%)
12	30	224 \pm 60*	0.017 \pm 0.006
13	30	188 \pm 34	0.017 \pm 0.005
14	30	189 \pm 36	0.021 \pm 0.009

*, mean \pm standard deviation

体の13.5~14.9 μm ,¹¹⁾ イワナ二倍体の16.5~17.8 μm ¹¹⁾と比較して倍數化されたと判断した。12~14カ月齢時のニジイワ3Nの尾数, 平均体重および平均GSIをTable 3に示した。いずれの個体においても雄の二次性徴は認められず, 生殖腺は糸状で平均GSIは0.017~0.021と著しく小さかった。同月齢のニジマス二倍体, イワナ二倍体の精巣や卵巣と比べても外観的に明らかに異なっていた。

考 察

イワナと同種のアメマス, *S. leucomaenis* では, 水温が1~6 $^{\circ}\text{C}$ の場合にふ化後131日ごろまでには生殖腺の性分化が始まり, 卵巣と精巣が形態的に確認できるとされている。¹²⁾ サクラマス, *O. masou* の生殖腺の性分

化は, 水温8 $^{\circ}\text{C}$ でふ化後4~5週で行われるとされ,¹³⁾ ニジマスでは水温11.2 $^{\circ}\text{C}$ で受精後60日前後に卵巣への形態変化が起こるとされている。¹⁴⁾ これらの種の卵巣分化の形態的特徴は, 生殖細胞のシスト形成とそれに続く卵形成のための減数分裂前期へと移行する生殖細胞の出現とされている。本試験におけるイワナ生殖腺組織の観察結果では, 生殖細胞のシスト形成が始まるのがふ化後36日目ごろからであり, 減数分裂前期の生殖細胞が出現したのがふ化後50日目ごろであった。したがって, イワナ生殖腺の卵巣の分化は, 水温11 \pm 1.5 $^{\circ}\text{C}$ 前後ではふ化後36~50日目ごろに始まると思われた。

性転換雄の作出については, ニジマスでは浮上後のMT経口投与が行われ, サクラマス, アマゴではふ化後から浮上までのMT浸漬処理と浮上後のMT経口投与の組合せが用いられている。本試験のイワナでは, 雄が作出されたMT経口投与濃度0.5mg/kg dietの試験区であっても, MT浸漬処理濃度が0.1 $\mu\text{g}/\ell$ と低い試験区は雄化率が低下する傾向があり, ニジマスで行われているMT経口投与だけでは, イワナ性転換雄は作出できない可能性が考えられた。また, MT浸漬処理が同じ4区~7区と12区, 13区の雄出現率結果を比較すると, MT経口投与濃度が0.5mg/kg dietから0.1mg/kg dietと低下した場合には雄出現率が低下する傾向が見られたことから, MT浸漬処理だけではイワナ性転換雄は作出できない可能性が考えられた。これらのことから, イワナ性転換雄の作出には, 適正濃度によるMT浸漬処理およびMT経口投与の組合せが必要と思われた。適正MT浸漬処理濃度としてはサクラマス¹⁵⁾ (ヤマメ¹⁶⁾), アマゴ⁵⁾ で用いられている10~100 $\mu\text{g}/\ell$ では, 処理間隔に関係なく, 本試験のイワナで生殖腺の不妊化が高い頻度で起こる傾向が認められたことから, MT処理濃度としては高すぎると考えられた。これらの処理濃度よりも低い0.5~1 $\mu\text{g}/\ell$ で雄化率が高い傾向が見られ, かつその処理頻度が高いと雄化率は向上したことから, 0.5~1 $\mu\text{g}/\ell$ の浸漬処理濃度で, その処理頻度を多くすることが有効と思われた。また, 同様にMT経口投与濃度が0.5mg/kg dietの試験区が0.1mg/kg dietの試験区と比べ不妊化の比率が高い傾向を示していることは, 0.5mg/kg dietの濃度でも個体によっては不妊化される濃度となることが考えられ, MTの餌料含有濃度ばかりでなくMTの総摂取量についても検討する必要が考えられた。また, ニジマス,⁶⁾ サクラマス,¹⁵⁾ アマゴ⁵⁾ での雄化率は80~100%の水準であるのに対し, 本試験のイワナの雄化率は15%程度にとどまっており, 今後MTの投与量, 投与方法, 投与期間等の処理法の更なる検討が必要であ

る。中村ら¹³⁾は、MT処理は生殖腺の性が形態的に未分化な時期に始められ、性分化が明らかとなる時期まで継続して成される必要があり、かつ可能な限り短期間で行うことが望ましいとしている。本試験の性転換雄の作出方法は煩雑であることから、今後はヤマメ、¹⁶⁾ マスノスケ、⁷⁾ ギンザケ⁸⁾ 等で試みられている浸漬1~2回処理のように、適切な時期に行う簡易処理についても検討する必要がある。なお、本試験においては、数回の雌性発生により得られた発眼卵をプールして処理したため、ふ化時期のばらつきから適正処理の時期をはずした個体があった可能性も考えられた。

ニジイワ3N雄は12カ月齢の産卵時期には雄の二次性徴が現れ、平均GSIが0.89~2.83¹⁷⁾であるのに対し、本試験において作出されたニジイワ3NのGSIの値は著しく低く、生殖腺も糸状であったことから、いずれの個体も雌であり、イワナ性転換雄の精子により全雌のニジイワ3Nが得られたことが確認された。また、イワナについても他のサケ科魚類^{6,17,18)}と同様に、性の決定機構は性染色体XX雌、XY雄と考えられた。

要 約

イワナ生殖腺の分化過程の観察で生殖細胞のシスト形成がふ化後36日~50日目に、初期卵巣の形態的特徴とされる減数分裂前期の細胞の出現がふ化後50日目に見られたことから、イワナの性分化開始時期はサクラマス、ニジマス等のサケ科魚類と同様に浮上時期前後と推定された。イワナ雌性発生二倍体魚を用いてのMT処理による性転換雄作出結果から、イワナ性転換雄作出にはふ化後から浮上までのMT浸漬処理と浮上後から60日間のMT経口投与が必要であり、浸漬処理濃度が0.5 μ g/l、その処理間隔が2日に1回の2時間、MT経口投与濃度が0.5mg/kg dietのMT処理を行った区が高い雄化率(15%)を示した。作出されたイワナ性転換雄から得られたニジイワ3Nはすべて雌と判断され、イワナ性転換雄を用いることで全雌ニジイワ3Nの生産は可能とされた。

謝 辞

本稿を稿するにあたり校閲および有益な助言を賜りました帝京大学医学部生物学教室中村 将助教授に心より御礼申し上げます。また、英文を校閲して下さった東京水産大学水族生理学研究室の大学院生Maria Raquel Moura Coimbraさんに感謝の意を表します。

文 献

- 1) 服部克也(1991) ホウライマスとイワナ間での異質三倍体におけるアロザイムおよび無斑遺伝子の発現に関する研究. 水産育種, 16, 43-50.
- 2) 服部克也(1995) ホウライマス雌とギンザケ雄間での無斑異質三倍体の作出. 愛知水試研報, 2, 41-45.
- 3) Hattori, K., Shirai, T., Kanda, F., Hirano, T., Suzuki, K. and Seko, Y. (1997) Spot-less allotriploids from female houraimasu (non-spotted rainbow trout) and male amago salmon are marketable. (投稿中)
- 4) 服部克也・岩田靖宏・水野正之・峯島史明(1995) ホウライマスを雌親とする異質三倍体魚の成熟. 愛知水試研報, 2, 33-40.
- 5) 白田 博(1989) アマゴの全雌生産とその特性. 水産育種, 14, 11-22.
- 6) Okada, H., Matumoto, H. and Yamazaki, F. (1979) Functional masculinization of genetic females in rainbow trout. *Bull. of the Jap. Soc. of Sci. Fish.*, 45 (4), 413-419.
- 7) Baker, I. J., Solar, I. and Donaldson, E. M. (1988) Masculinization of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) by immersion treatments using 17 α -Methyltestosterone around the time of hatching. *Aquacult.*, 72, 359-367.
- 8) Piferrer, F. and Donaldson, E.M. (1989) Gonadal differentiation in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, after a single treatment with androgen or estrogen at different stages during ontogenesis. *Aquacult.*, 77, 251-262.
- 9) Suzuki, R. and Fukuda, Y. (1971) Survival potential of F1 hybrids among salmonid fishes. *Bull. Freshwater Fish. Res. Lab.*, 21, 69-83.
- 10) 服部克也・本田是人・峯島史明(1988) ニジマス・アマゴ・イワナ間での異質三倍体魚の作出について. 愛知水試業務報告, pp.54-55.
- 11) 山梨県魚苗センター(1987) 昭和62年度バイオテクノロジー連絡試験計画案. 第12回全国養鱒技術協議会要録, 岩手県, pp.143-147.
- 12) Nakamura, M. (1982) Gonadal sex differentiation in Whitespotted Char, *Salvelinus leucomaenis*. *Jap. Ichthyol.*, 28 (4), 431-436.
- 13) 中村 将・高橋裕哉・広井 修(1974) サクラマス (*Oncorhynchus masou*) の生殖腺の性分化過程. 北海道さけ・ますふ化場研究報告, 28, 1-8.
- 14) Takashima, F., Patino, R. and Nomura, M. (1980) Histological Studies on the sex differentiation in rainbow trout. *Bull. of Jap. Soc. of Sci. Fish.*, 46 (11), 1317-1322.
- 15) 小出展久・太田博巳・岡田鳳二(1991) サクラマス偽雄の作出と維持の現状. 養殖6月号, 緑書房, 東京, pp.124-127.
- 16) 小池利通(1990) ヤマメ性転換試験-II. 新潟県内水面水産試験場調査研究報告, 16, 89-92.
- 17) Hunter, G. A., Donaldson, F. W. and Edgell, P. R. (1982) Production of all-female and sterile coho salmon, and experimental evidence for male heterogamety. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 111, 367-372.
- 18) Johnstone, R. and Youngson, A. F. (1984) The progeny of sex-inverted female Atlantic salmon (*Salmo Salar* L.). *Aquacult.*, 37, 179-182.

