

シロギス雄のビテロゲニン産生能に及ぼす成熟度の影響

堀田公明^{*1,§}・岸田智穂^{*1}・佐藤裕介^{*1}・瀬戸熊卓見^{*1,a}・中村幸雄^{*1,b}
足立伸次^{*2}・山内皓平^{*2}

Influence of maturation status on vitellogenin induction in the Japanese whiting *Sillago japonica*

Komei Hotta^{*1,§}, Chiho Kishida^{*1}, Yusuke Sato^{*1}, Takumi Setoguma^{*1,a},
Yukio Nakamura^{*1,b}, Shinji Adachi^{*2} and Kohei Yamauchi^{*2}

要約: シロギス雄の成熟度合の違いによるビテロゲニン (Vg) 産生能を調べるために, 飼育水中に異なる2濃度の17β-エストラジオール (E₂) を添加しながら (設定値10pg/mLと50pg/mL (実測値8pg/mLと36pg/mL)) 精子形成開始期と末期の雄を2週間飼育して, 血中のVgおよび性ホルモン濃度と精巣の組織観察を行った。その結果, 精子形成開始期の雄の血中Vg量は精子形成末期の雄の値に比べ高値を示した。また, 精子形成開始期の雄の精巣のGSI (生殖腺重量×100/体重) および雄性ホルモン (11-ケトテストステロン) 量はE₂曝露の影響により減少したが, 精子形成末期の雄には明確な影響は認められなかった。以上の結果は, Vg産生能は成熟度によって異なることを示しており, 精子形成開始期の雄はエストロゲンの曝露に対し高い感受性を有することが示唆された。

キーワード: シロギス, ビテロゲニン, 成熟, 精子形成, エストロゲン, 曝露

Abstract: By comparing male Japanese whiting during early spermatogenesis and late spermatogenesis, we have investigated whether maturation status is involved in vitellogenin (Vg) induction (induction of serum vitellogenin after exposure to estrogen). Fish were exposed, via the surrounding water, to two different concentrations of 17β-estradiol (E₂; E₂ conc. nominal 10 and 50 pg/mL (actual 8 and 36 pg/mL)). After 14 days, all fish were sampled, and gonadal development and abnormality after E₂ exposure were determined by calculation of the gonadosomatic index (GSI: gonad weight x 100 / body weight) and histological examination of the gonads; in addition, serum levels of steroid hormones and vitellogenin were measured.

Serum levels of Vg were higher in fish during early spermatogenesis than in fish during late spermatogenesis. Moreover, significantly lower testis mass (GSI) and serum levels of androgen (11-ketotestosterone) were observed in fish during early spermatogenesis than in fish during late spermatogenesis. The results indicate that Vg induction is influenced by maturation status, suggesting that male fish are more sensitive to estrogenic exposure during early spermatogenesis.

Keywords: Japanese whiting, vitellogenin, Vg, maturation, spermatogenesis, estrogen, exposure

まえがき

魚類の血中に存在するビテロゲニン (Vg) は雌において卵黄タンパク質前駆物質であり, 魚卵

の卵黄を構成する材料となる重要なタンパク質である。一方, 雄においてもエストロゲンが肝臓に作用することでVgが産生され血中に分泌されることが以前より知られており (Hori *et al.*, 1979; Idler and Campbell, 1980), 近年, その性質を利

(2008年2月7日受付, 2008年3月19日受理)

*1 財団法人 海洋生物環境研究所 実証試験場 (〒945-0017 新潟県柏崎市荒浜4-7-17)

§ E-mail: hotta@kaiseiken.or.jp

*1,a 財団法人 海洋生物環境研究所 中央研究所 (〒299-5105 千葉県夷隅郡御宿町岩和田300)

*1,b 現住所: 財団法人 海洋生物環境研究所 事務局 (〒101-0051 東京都千代田区神田神保町3-29帝国書院ビル5F)

*2 北海道大学大学院水産科学研究院 (〒041-8611 北海道函館市港町3-1-1)

用して雄魚の血中Vgを指標とした水域のエストロゲン様物質の検索が盛んに行われるようになった。(財)海洋生物環境研究所においても、水産庁の委託を受けて1999年より日本沿岸域に生息する水産有用魚類を調査対象とした内分泌かく乱物質(エストロゲン様物質)の影響実態の解明を進めてきた(中村, 2004)。その一環として実施されたシロギスに関する調査研究の中で、海域のシロギス雄魚の血中Vgが夏季を中心として増加する季節変化を示すことが見出され(堀田ら, 2002)、さらにその季節性は飼育下のシロギス雄によっても確認された(Hotta *et al.*, 2003)。このため、血中Vgを指標として内分泌かく乱物質の影響評価を行うに当たり、血中Vgの変動要因を明らかにしておくことが必要と考えられた。シロギス雄の血中Vgの上昇がみられた夏季はシロギスの成熟期であり、雄魚自身の成熟の進行が血中Vgの季節変化を形成する要因となっている可能性がある。そこで、異なる成熟段階の雄を用意して、魚類の主要なエストロゲンである17 β -エストラジオール(E₂)の曝露飼育を行い、雄の成熟度とVgの血中量(Vg産生能)との関係について検討した。

方 法

供試魚 一般に夏季産卵の魚の産卵期の終了は短日条件が引き金となることから(羽生, 1991)、産卵期のシロギス(産卵盛期は6～9月)を短日条件で飼育することにより生殖腺が退行すると考えられた。そこで異なる成熟段階の2群の雄を得る目的で、自然産卵された卵から養成されたシロギス1年魚(体長11-14 cm)を、容量1 m³の水槽2基に50尾ずつ収容し、1基の水温・日長条件を17℃・自然日長、他の1基を17℃・8時間明期16時間暗期(9時点灯17時消灯)として成熟期に当たる6月から9月にかけて約3ヶ月間予備飼育を行った。その結果、17℃・自然日長で飼育した雄の精巣は成熟が持続して精子形成末期(末期群)、17℃・8 Lで飼育した雄の精巣は精子形成開始期(開始期群)に退行し、曝露実験開始時の末期群と開始期群のGSI(gonadosomatic index; 生殖腺重量×100/体重)はそれぞれ1.17と0.17を示した(Fig. 1)。

実験設定 流水式のチタン製円形水槽(0.15 m³; 海水流量0.09 m³/時)10基を用いて、その内の5基には末期群の雄をそれぞれ5尾、残りの5基に

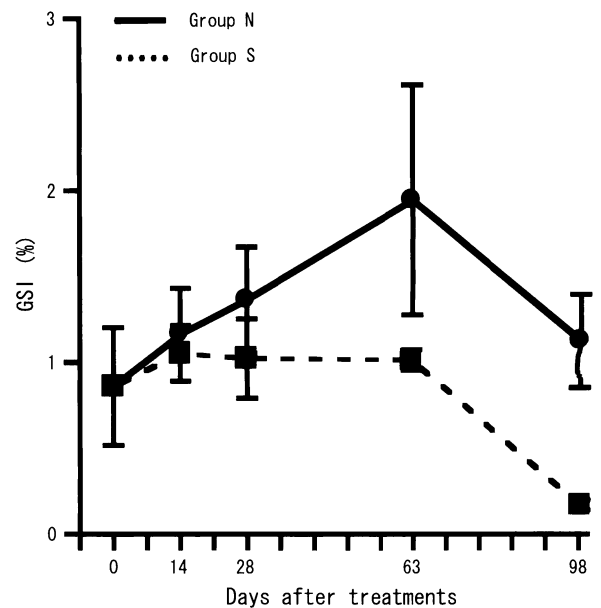


Fig. 1 Changes in the gonadosomatic index (GSI) in male Japanese whiting held at 17°C/natural photoperiod (Group N) and at 17°C/8L (Group S). Data are mean $\pm$ SE (n=3-5).

は開始期群の雄をそれぞれ5尾収容した。日長は収容当日に15L(5時点灯20時消灯)に切换え、飼育水温は1週間かけて25℃まで上昇させた後、末期群、開始期群を収容した水槽各1基(各5尾)をイニシャルコントロールとしてサンプリングした。残り8基の水槽についてE₂曝露区2区(10 pg/mL区, 50 pg/mL区)、およびコントロール2区(コントロール区とDMSO(ジメチルスルホキシド)コントロール区)を末期群および開始期群の水槽1基ずつに割り当て、水温および日長条件を25℃/15 Lとして2週間の曝露飼育を行った。E₂曝露区ではDMSOに溶解したE₂を微量定量ポンプ(イワキ電磁定量ポンプEH型)で、水槽内濃度がそれぞれの設定濃度となるように水槽に添加しながら飼育を行った。また、DMSOコントロール区ではDMSOのみをOECD魚類初期生活段階毒性試験のテストガイドライン(TG210)を参考に100 ng/mL以下となるように添加した(設定値: 25 ng/mL)。実験期間中の水温は25 $\pm$ 0.6℃, pHは8.0-8.2, DOは91-105%の範囲にあり、各水槽の供試魚の生存率はいずれも80%以上で供試魚の飼育環境は良好であった。

曝露終了時に全供試魚を取り上げて、魚体測定後直ちに尾柄部を剃刀で切断して採血した。肝臓と生殖腺の重量を測定した後に、GSIとHSI(hepatosomatic index; 肝臓重量×100/体重)を算

Table 1 17 β -Estradiol (E₂) concentrations in the aquarium seawater in the different experimental groups over the 14-day treatment

Treatment	E ₂ concentration (pg/mL)							
	1 day		7 days		10 days		14 days after	
	Group N	Group S	Group N	Group S	Group N	Group S	Group N	Group S
Control	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
DMSO control	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
10 pg/mL E ₂	7.0	6.9	7.3	7.4	8.7	8.3	7.4	8.7
50 pg/mL E ₂	32	31	35	35	41	39	37	37

出した。また、生殖腺の一部をブアン液固定し、後に常法によりパラフィン切片を作製し組織観察を行った。血液は一晚4℃で静置した後、15,000Gで5分間遠心分離を行い血清を分離して、Vgおよびホルモン分析に使用するまで-80℃で保存した。血中Vg濃度はELISA法 (Hotta *et al.*, 2003) により測定した。測定した血中ホルモンは、E₂

と11-ケトテストステロン (11KT) で、このうちE₂はDELFIA エストラジオール測定キット (PerkinElmer Japan Co., LTD) を用いて、また11KTは、Yamada *et al.* (1997) の方法に基づいて、いずれも時間分解蛍光免疫測定法 (TR-FIA) により測定した。

図に掲載した数値は平均値±標準誤差で表し、

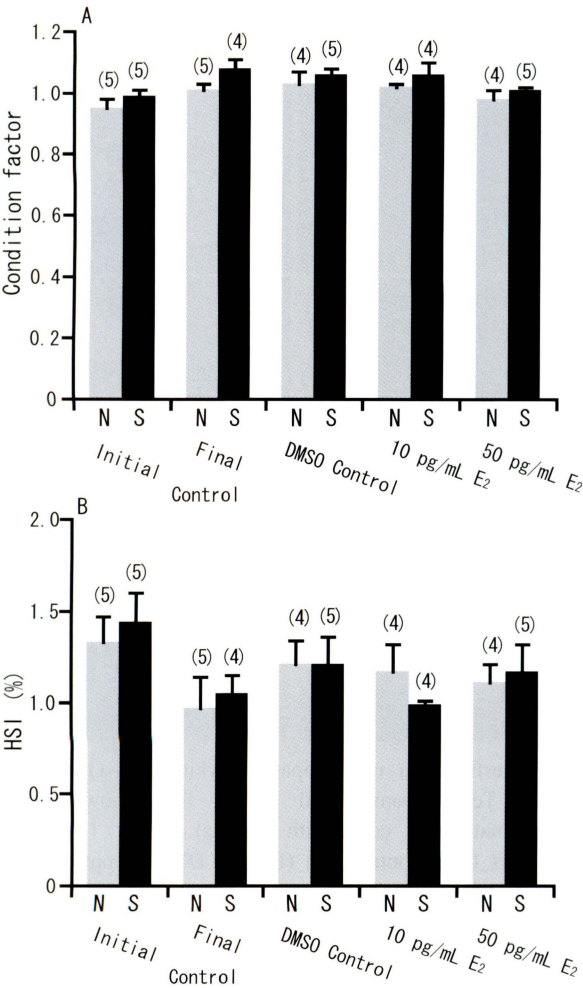


Fig. 2 Condition factor (A) and hepatosomatic index (HSI) (B) in male Japanese whiting in Group N (N) and Group S (S) at the end of 14 days exposure to 17 β -Estradiol (E₂). Data are mean $\pm$ SE. Numbers in parentheses indicate the number of fish analyzed.

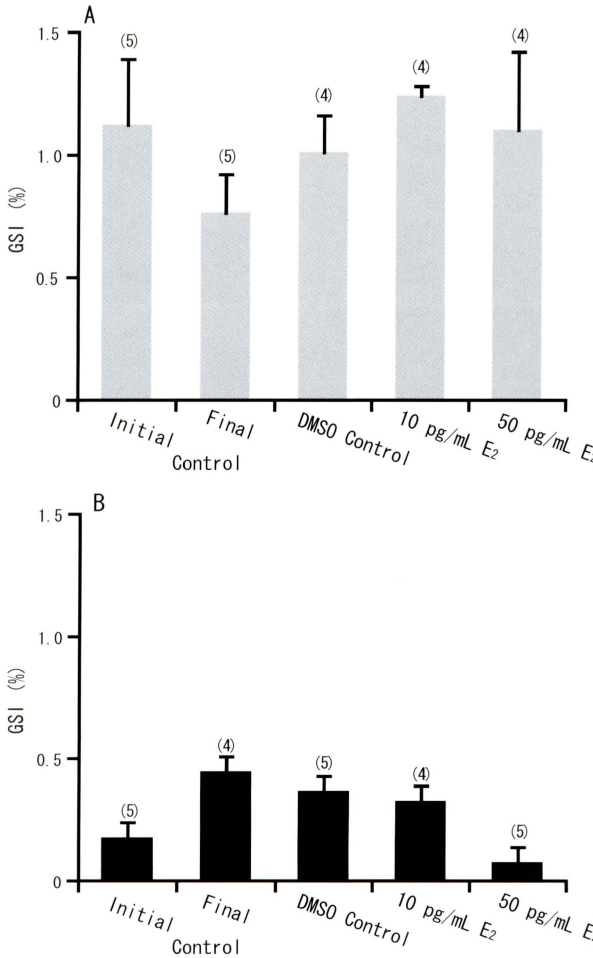


Fig. 3 Gonadosomatic index (GSI) in male Japanese whiting of Group N (A) and Group S (B) at the end of 14 days exposure to E₂. Data are mean $\pm$ SE. Numbers in parentheses indicate the number of specimens analyzed.

3 群以上の平均値の有意差の検定は一元分散分析を行った後、Dunnettの多重比較を用いた。

海水中E₂濃度の測定 E₂添加開始後、1, 7, 10 および14日目に採水を行い、GC-MS法により飼育海水中E₂濃度を測定した (Table 1)。10pg/mL 区のE₂実測値の平均は、末期群と開始期群でそれぞれ、7.6pg/mL, 7.8pg/mLで、50pg/mL区の値は、それぞれ36.3pg/mL, 35.5pg/mLであり、各濃度とも末期群と開始期群の間に差はみられなかった (Student's *t* test $P > 0.05$)。

結 果

1. 肥満度およびHSI

末期群と開始期群の肥満度 (Condition factor; 体重 (g) $\times 100$ / 体長 (cm)³) をFig. 2Aに示した。末期群と開始期群のイニシャルコントロールおよび終了時のすべての試験区の肥満度は0.95-1.08の範囲にあり、いずれの飼育区間とも肥満度

に有意な差はみられず、水温・日長処理およびE₂の影響による体型の変化はみられなかった。

末期群と開始期群のHSIの結果をFig. 2Bに示した。末期群と開始期群のイニシャルコントロール区のHSIは、それぞれ1.33, 1.44で差はみられなかった。また、終了時のコントロール2区および2つのE₂曝露区のHSIは、いずれも0.97-1.21の範囲にあり、水温・日長処理およびE₂の影響による肝臓の肥大や萎縮はみられなかった。

2. GSI

末期群と開始期群のGSIをFig. 3に示した。末期群のイニシャルコントロール区、終了時のコントロール2区およびE₂曝露区2区のGSIは、0.76-1.24の範囲にあり、いずれの試験区間のGSIにも差はみられなかった (Fig. 3A)。

E₂曝露終了時の開始期群のコントロール区のGSI (0.44) はイニシャルコントロール区 (0.17)

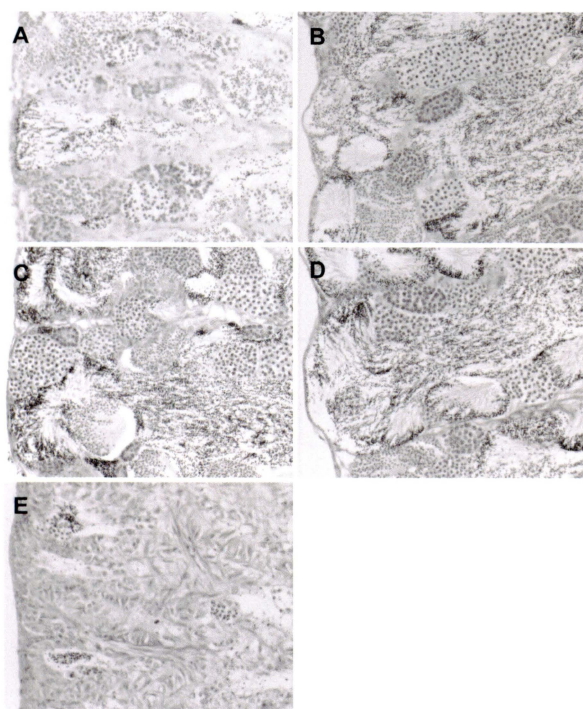


Fig. 4 Testis from male Japanese whiting in Group N. (A) Testis from initial control fish, showing scarce spermatozoa in lobule and thickened lobule walls. (B), (C) Testis from control fish (B) and DMSO control fish (C) at the end of the experiment, showing all stages of germ cell development. (D) Testis from fish exposed to 10 pg/mL E₂ for 14 days, showing normal development similar to that of control fish. (E) Testis from fish exposed to 50 pg/mL E₂ for 14 days, showing degradation of germ cells. Scale bars represent 50 μ m.

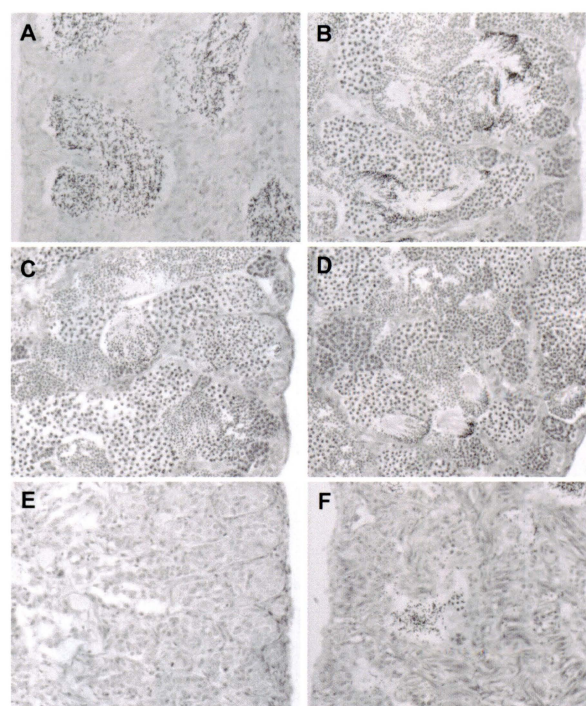


Fig. 5 Testis from male Japanese whiting in Group S. (A) Testis from initial control fish, showing no spermatogenic cells with residual sperm. (B), (C) Testis from control fish (B) and DMSO control fish (C) at the end of the experiment, showing all stages of germ cell development. (D), (E) Testis from fish exposed to 10 pg/mL E₂ for 14 days. Two out of four fish exposed to 10 pg/mL E₂ showed normal development of germ cells (D); the other two fish showed degradation of germ cells (E). (F) Testis from fish exposed to 50 pg/mL E₂ for 14 days, showing degradation of germ cells. Scale bars represent 50 μ m.

に比べ有意 ($P<0.01$) に増加したが、50pg/mL区のGSI (0.07) はコントロール区に比べ有意 ($P<0.01$) に低く開始時と同じレベルに留まっていた (Fig. 3B)。

3. 精巣の組織学的変化

末期群 末期群の精巣組織像をFig. 4 (A-E) に示した。イニシャルコントロール区の組織像には精小嚢内に精子が放出された後の間隙が目立ち、精巣形成末期の様相を呈した (A)。曝露終了時のコントロール2区の精巣組織像には、各精小嚢中に活発に増殖する精原細胞から精子に至るすべての段階の生殖細胞を含む包嚢が多数観察されたことから、末期群の雄は曝露期間中に精子形成が再び活性化したと考えられる (BおよびC)。

10pg/mL区の組織像はコントロール区と同様の組織像を示し、特に異常は認められなかった (D)。しかし、50pg/mL区では生殖細胞の退縮および間

質細胞の増殖が観察され、明らかに精子形成は抑制されていた (E)。

開始期群 開始期群の精巣組織像をFig. 5 (A-F) に示した。イニシャルコントロール全個体の精巣には精子形成期の生殖細胞は、ほとんどみられず未成熟期の様相を示した (A)。しかし、曝露終了時のコントロール2区の精巣の各精小嚢中には各発達段階の生殖細胞を含む包嚢が多数観察され、開始期群の精巣が精子形成を開始したことが確認された (BおよびC)。

10pg/mL区ではコントロール区と同様の組織像を示す個体 (D) と明らかに精子形成が抑制されている個体 (E) が共存した。50 pg/mL区では精子形成は明らかに抑制されていた (F)。

4. 血中ステロイドホルモンおよびビテログニン量

血中11KT量 末期群の血中11KT濃度をFig. 6 (A) に、開始期群のそれをFig. 6 (B) に示した。末期群のイニシャルコントロール区の血中11KT濃度は、成熟盛期のレベル (12ng/mL) を示したが、曝露終了時のコントロール2区の血中11KTの値はそれぞれ2.80ng/mLと5.00ng/mLとなり、イニシャルコントロール区の値に比べ有意 ($P<0.01$) に減少した。曝露終了時の10pg/mL区の11KT値はコントロール区に比べると高値だったがDMSOコントロール区とは差がなく、また、50pg/mL区の値はコントロールおよびDMSOコントロール区のいずれとも差がなかった。

一方、開始期群では、曝露終了時のコントロー

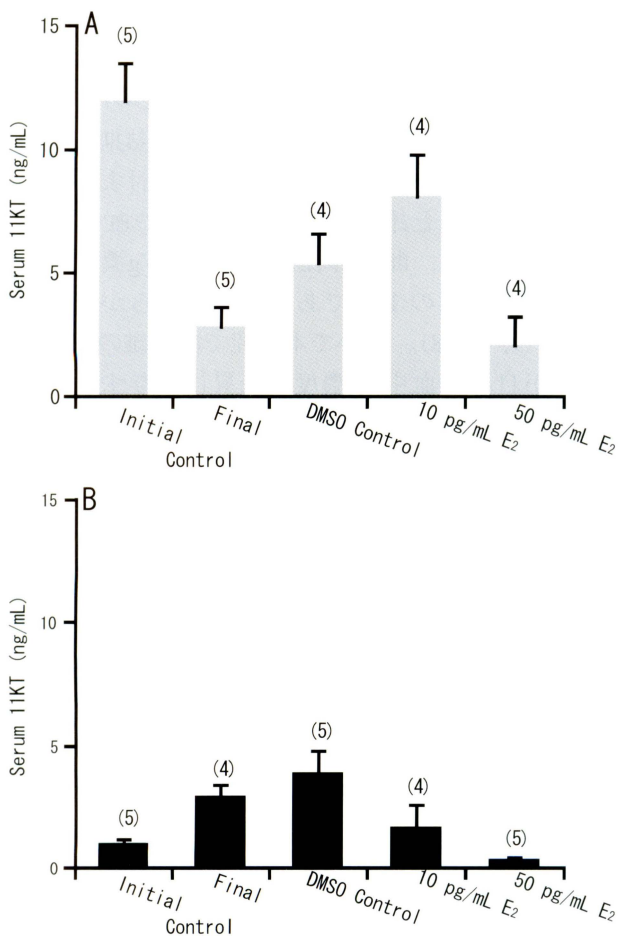


Fig. 6 Serum levels of 11-ketotestosterone (11KT) in male Japanese whiting of Group N (A) and Group S (B) at the end of 14 days exposure to E₂. Data are mean $\pm$ SE. Numbers in parentheses indicate the number of specimens analyzed.

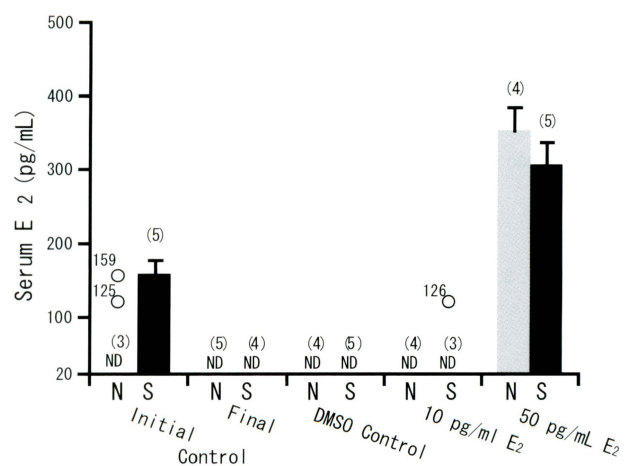


Fig. 7 Serum levels of E₂ in male Japanese whiting in Group N (N) and Group S (S) at the end of 14 days exposure to E₂. Data are mean $\pm$ SE. E₂ concentrations less than the detection limit (<30 pg/mL) are denoted by ND. Numbers in parentheses indicate the number of specimens.

ル区の値 (4ng/mL) は、イニシャルコントロール区の値 (1ng/mL ; 成熟初期のレベル) に比べ増加し、試験期間中にコントロール区の精子形成が活発になったことを示した。開始期群の10pg/mL区では個体によって血中11KTの減少がみられたものの、コントロール区の値に比べ有意な減少ではなかった。しかし、50pg/mL区ではコントロール区の値に比べ有意 ($P<0.05$) に低い値 (0.31 ng/mL) を示した。

血中E₂量 末期群と開始期群の血中E₂濃度を、それぞれFig. 7に示した。末期群のイニシャルコントロール区の血中E₂濃度は5個体中3個体が検出限界以下 (ND : <30pg/mL) (残る2個体の値はそれぞれ125, 159pg/mL)、開始期群のイニシャルコントロール区では全個体から検出されその平均は157pg/mLを示した。曝露終了時の両群のコントロール区の値はいずれもNDとなっていた。末期群と開始期群のE₂曝露区の血中E₂濃度は、10pg/mL区がそれぞれND (ただし、短日区の1個体のみ126pg/mLを検出)、50pg/mL区がそれぞれ352pg/mLと305pg/mLで、50pg/mL区の血中E₂濃度はコントロール区の値に比べ有意 ($P<0.01$) に高い値を示したが、末期群と開始期群の値に有意差はみられなかった。

血中Vg量 末期群と開始期群の血中Vg濃度をそれぞれ、Fig. 8に示した。曝露開始時および終了時のコントロール2区の血中Vg濃度はND (<50

ng/mL) - 0.07μg /mLだった。E₂曝露区の血中Vg濃度は、末期群と開始期群でそれぞれ、10pg/mL区が、ND, 3.30μg/mL, 50pg/mL区が、16,800μg/mL, 39,200μg/mLで、10pg/mL区と50pg/mL区でいずれも開始期群の血中Vg濃度が末期群の値に比べ有意 ($P<0.05$) に高い値を示した。

考 察

著者らは自然条件下で飼育されたシロギス雄の血中Vgは成熟期に数百ng/mLから1 μm/mL程度検出され、それ以外の時期には検出限界以下となることを報告した (Hotta *et al.*, 2003)。Kokokiris *et al.* (2001) は、ヨーロッパマダイ雄の血中Vgの周年変化を調べた結果、産卵期に高い値を示したと報告している。また、Haga *et al.* (2001) は、カットスロートトラウトおよびサクラマスにおいて、産卵期の雄の血中Vg濃度はそれ以外の時期に比べ高い傾向を示すことを報告している。シロギスの成熟期に雄の血中Vgが上昇する要因として、成熟した雌の存在、雄の成熟の進行、水温上昇 (シロギスの産卵期は夏季であるため)、等が考えられる。そこで、著者らはまず成熟期の雌の存在が雄の血中Vgに及ぼす影響を検討するために、雌雄混合と雄単独で飼育した雄の血中Vg濃度を比較して、雌の存在が雄の血中Vg濃度を上昇させる要因の1つであることを明らかにした (堀田ら, 2008)。次いで本研究では、雄の成熟の進行が自身の血中Vg濃度の上昇に関与する可能性について検討を行った。異なる成熟段階の2群の雄を用意するために、E₂曝露を行う前に2群の雄を異なる日長条件下で飼育した。シロギスは、水温による成熟の制御が容易な魚種であり、成熟の促進や遅延には飼育水温を操作することがもともと確実な方法である。しかし、水温条件を異にして飼育を行うと、成育やVgの産生器官である肝臓の状態に差を生じる。このため、本研究では2群の雄の成熟以外の生理状態をなるべく同じ条件にするために、2群の雄の飼育水温は同条件として、日長のみを変えて飼育を行った。その結果、肥満度やHSIから判断する限り、生育状態や肝臓の大きさに差を付けることなく (Fig. 2)、成熟段階を異にした2群の雄 (末期群と開始期群のGSIが、それぞれ1.12と0.17) を準備することができた (Fig. 1)。

末期群では終了時のコントロール区のGSIがイ

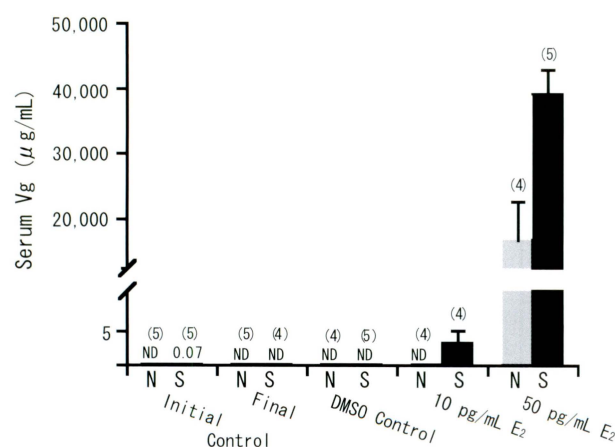


Fig. 8 Serum levels of vitellogenin (Vg) in male Japanese whiting in Group N (N) and Group S (S) at the end of 14 days exposure to E₂. Data are mean $\pm$ SE. Vg concentrations in all control fish and fish from Group S exposed to 10 pg/mL E₂ were less than the detection limit (<50 ng/mL). Numbers in parentheses indicate the number of specimens analyzed.

ニシャルコントロール区と比べ差がなかったのに対し、開始期群では試験終了時のGSI (0.44) が開始時 (0.17) に比べて増加した (Fig. 3)。これは、成熟初期の段階にある開始期群では、曝露試験開始時の日長および水温の操作 (E_2 曝露前の日長・水温条件, 短日・低水温 (8 L・18°C) から E_2 曝露期間中の長日・高水温 (15 L・25°C) への切換え) により、精子形成が活性化し、精巣発達が促されたためと考えられる。一方、末期群では、試験開始時に水温を上昇させたが、GSIに変化はみられず組織観察結果からも精子形成は末期に入っているとみられた。開始期群のGSIは E_2 曝露の影響を受けて減少したが、末期群のGSIは影響がみられなかった。アルキルフェノール類のエストロゲン様作用を調べた研究において、供試魚に用いたニジマス雄の成熟段階によりGSIに対する影響が異なることが報告されており (Jobling *et al.*, 1996)、本試験の末期群と開始期群におけるGSIに対する影響の差も成熟段階が異なることに由来すると考えられる。

11KTは雄魚の精子形成に係る主要なステロイドホルモンであるが、 E_2 は11KTの産生を抑制することで精巣発達を妨げることが報告されている (Yamaguchi *et al.*, 2006)。本試験においても開始期群の曝露終了時の血中11-ケトテストステロンは E_2 の曝露濃度の上昇にともなって減少する傾向を示し (Fig. 6B)、血中11KTが有意に減少した50pg/m区の精子形成は、明らかに抑制されていた (Fig. 5F)。一方、末期群のイニシャルコントロール区の血中11KT値は成熟末期にあったことから高値を示した。末期群の曝露終了時のコントロール区およびDMSOコントロール区の値の個体差は大きかったが、これは生殖腺の成熟から退行の過渡期を含む成熟末期には成熟関連ホルモンの個体差が大きくなるためと考えられる。

開始期群のイニシャルコントロール区では E_2 曝露前にもかかわらず E_2 が明確に検出された (Fig. 7)。多くの魚類において精原細胞の増殖から精子完成に至る精子形成過程は11KTにより内分泌的に調整されるが、精原細胞増殖期の前の精原幹細胞の出現および増殖には E_2 の支配を受けることが明らかにされている (Miura *et al.*, 1999)。開始期群のイニシャルコントロール区は、飼育水温・日長条件を8 L・17°Cから16 L・25°Cに切換えた直後であり、この飼育条件の切換えが E_2 産生の引き金となり精子形成を開始したと推測され

る。

曝露終了時の末期群と開始期群の50 pg/mL区の血中 E_2 濃度は300~350 pg/mL (Fig. 7) で、ともに血中には海水中濃度 (36 pg/mL) の約10倍の E_2 が蓄積されたが、両群の血中 E_2 濃度に差はみられなかった。それにもかかわらず、試験終了時の開始期群 (精子形成初期) の血中Vg濃度が、末期群 (精子形成末期) に比べ高値であったことは (Fig. 8)、精巣の精子形成の初期において特に E_2 応答 (Vg産生能) が高まることを示唆している。

本試験により、雄の成熟度が雄血中Vgの上昇の要因となる可能性があることが明らかとなった。エストロゲン様物質の指標として、シロギス雄の血中Vgを用いる際には、用いる魚の成熟度を十分に考慮にいれて評価を行う必要があると考えられる。

謝 辞

本論文を御校閲下さった東京大学名誉教授平野禮次郎先生、東京大学名誉教授沖山宗雄先生、海洋生物環境研究所の城戸勝利理事、木下秀明博士、太田雅隆博士、道津光生博士に謹んで感謝の意を表す。また、この論文は、水産庁から委託された内分泌かく乱物質魚介類影響実態把握等調査の報告のうち一部を公表するものであり、関係各位に謝意を表す。

引用文献

- Haga, A., Fukada, H., Fujita, T., Hiramatsu, N. and Hara, A. (2001). Estimation of baseline vitellogenin level in male salmonid serum. *Environ. Sci.*, **8**, 173.
- 羽生 功 (1991). 生殖周期. 「魚類生理学」(板沢保男, 羽生 功編), 恒星社厚生閣, 東京, pp.287-325.
- Hori, S.H., Kodama, T. and Tanahashi, K. (1979). Induction of vitellogenin synthesis in goldfish by massive doses of androgens. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **37**, 306-320.
- Hotta, K., Watanabe, T., Kishida, C., Nakamura, Y., Ohkubo, N., Matsubara, T., Adachi, S. and Yamauchi, K. (2003). Seasonality of serum levels of vitellogenin in male Japanese

- whiting, *Sillago japonica*, reared under natural temperature and photoperiod. *Fish. Sci.*, **69**, 555-562.
- 堀田公明・渡辺剛幸・岸田智穂・眞道幸司・三浦正治・中村幸雄 (2002). 複数海域におけるシロギス雄の血中ビテロジェニン濃度と生殖腺の季節変化. 平成14年度日本水産学会大会講演要旨集, 173pp.
- 堀田公明・渡辺剛幸・岸田智穂・中村幸雄・井尻成保・足立伸次・山内皓平 (2008). シロギス雄の血中ビテロゲニン量に及ぼす雌魚の影響. 日水誌, **74**, 20-25.
- Idler, D.R. and Campbell, C.M. (1980). Gonadotropin stimulation of estrogen and yolk precursor synthesis in juvenile rainbow trout. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **41**, 384-391.
- Jobling, S., Sheahan, D., Osborne, J.A., Matthiessen, P. and Sumpter, J.P. (1996). Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.*, **15**, 194-202.
- Kokokiris, L., Le Menn, F., Kentouri, M., Kagara, M. and Fostier, A. (2001). Seasonal cycle of gonadal development and serum levels of vitellogenin of the red porgy, *Pagrus pagrus* (Teleostei: Sparidae). *Mar. Biol.*, **139**, 549-559.
- Miura, T., Miura, C., Ohta, T., Nader, Manal R., Todo, T. and Yamauchi, K. (1999). Estradiol-17 β stimulates the renewal of spermatogonial stem cells in males. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **264**, 230-234.
- 中村幸雄 (2004). 水産動物における内分泌かく乱物質影響の実態把握. 日水誌, **70**, 972-976.
- Yamada, H., Satoh, R., Yamashita, T., Kambegawa, A. and Iwata, M. (1997). Development of a time-resolved fluoroimmunoassay (TR-FIA) for testosterone: measurement of serum testosterone concentrations after testosterone treatment in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, **106**, 181-188.
- Yamaguchi, S., Gen, K., Okuzawa, K., Matsuyama, M. and Kagawa, H. (2006). Influence of estradiol-17 β , testosterone, and 11-ketotestosterone on testicular development, serum steroid hormone, and gonadotropin secretion in male red sea bream *Pagrus major*. *Fish. Sci.*, **72**, 835-845.