

原著論文

シロギスの性分化に及ぼす17 β -エストラジオール曝露の影響

堀田公明^{*1 §}・岸田智穂^{*2}・瀬戸熊卓見^{*3}・渡邊裕介^{*1}・
道津光生^{*2}・足立伸次^{*4}

Effects of 17 β -estradiol Exposure on Gonad Differentiation in Japanese Whiting
Sillago japonica

Komei Hotta^{*1 §}, Chiho Kishida^{*2}, Takumi Setoguma^{*3},
Yusuke Watanabe^{*1}, Kosei Dotsu^{*2} and Shinji Adachi^{*4}

要約: 種苗生産したシロギス稚魚を用いて, 生殖腺の性分化に及ぼす17 β -エストラジオール(E2)の影響を調べた。飼育水中に異なる3濃度のE2 (10, 30, 100ng/L区) およびジメチルスルホキシド (DMSO: 助剤対照区) を添加しながら, 生殖腺が未分化な稚魚 (孵化後30日, 平均標準体長15mm) 各区400個体を21日間飼育し, その後E2およびDMSO無添加の清浄な海水で孵化後100日まで飼育して生殖腺の組織観察を行った。その結果, 30ng/L区および100ng/L区で性比が雌に偏った。また30ng/L区と100ng/L区の一部の個体に精巣卵が認められた。以上より, シロギスでは生殖腺が未分化な時期を含む稚魚期に, 30ng/L以上のE2に3週間程度曝露されると, 生殖腺の性分化や精巣の発達に影響が現れることが明らかとなった。

キーワード: シロギス, 性分化, 性比, 精巣卵, 生殖腺, E2, 17 β -エストラジオール, 曝露

Abstract: We examined the effect of 17 β -estradiol (E2) on gonadal sex differentiation in laboratory-reared juvenile Japanese whiting *Sillago japonica*. Fish with undifferentiated gonads (30 days post hatch (dph), average standard length 15mm, 400 fish in each experiment group) were water-exposed for 21 days to three different concentrations of E2 (10, 30, 100ng/L nominal (10, 30, 96ng/L actual)) or solvent control (dimethylsulfoxide; 25mg/L). Fish were transferred to clean sea-water and reared until 100 dph, when all fish were sampled and sex ratio (♂/♀) and gonadal abnormality were determined by histological observations. Sex ratio was skewed towards female at 30 and 100 ng/L and testis-ova (gonadal intersex) were observed in some fish exposed to 30ng/L and 100ng/L. These results suggest that gonadal sex differentiation and testis development in male Japanese whiting could be affected by exposure to E2 concentrations greater than 30ng/L for three weeks during juvenile stages with undifferentiated gonads.

Key words: *Sillago japonica*, sex differentiation, sex ratio, testis-ova, E2, 17 β -estradiol, exposure

(2015年4月9日受付, 2015年8月17日受理)

*1 公益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

*2 公益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番地)

*3 元海生研職員

*4 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)

まえがき

エストロゲンまたはエストロゲン作用を有する化学物質(エストロゲン様内分泌かく乱化学物質: EEDCs) (原, 2013) に曝露された雄魚の血中には雌特異タンパク質のビテロゲニンが検出されることから, 雄魚の血中ビテロゲニンがEEDCsの影響指標に用いられるようになった (Sumpter and Jobling, 1995)。一方, ビテロゲニンが検出された雄魚の精巣を組織学的に調べても, 必ずしも生殖腺の異常は見出されない (飯島ら, 2001; 堀田ら, 2002; Ohkubo *et al.*, 2003; Kleinkauf *et al.*, 2004)。そこで, 雄魚の生殖機能へのEEDCsの影響指標として着目されたのが精巣中の卵母細胞様の細胞, いわゆる, 精巣卵である (Gronen *et al.*, 1999)。精巣卵はこれまでに実施された日本の沿岸域におけるEEDCs影響の実態調査においてもマコガレイ *Pleuronectes yokohamae* (橋本, 2000), シロギス *Sillago japonica* (堀田ら, 2002), スズキ *Lateolabrax japonicus*, ボラ *Mugil cephalus*, コノシロ *Konosirus punctatus*, サッパ *Sardinella zunasi*, ヒイラギ *Nucleolina nuchalis*, マアナゴ *Conger myriaster* (和波ら, 2003, 2004, 2005) の精巣中に見出されている。魚類の性は水温等の環境要因によっても影響を受ける場合があることが知られており, 性分化前に高水温処理を行うと, ヒラメ *Paralichthys olivaceus* (Kitano *et al.*, 1999), マツカワ *Verasper moseri* (Goto *et al.*, 1999), マコガレイ (Goto *et al.*, 2000) は雄への分化を, クロソイ *Sebastes schlegeli* (Omoto *et al.*, 2010) では雌への分化を誘発すると報告されている。しかし, 魚類において高温処理によって精巣卵形成を報告した例は見当たらないことから, 海産魚類の精巣卵形成に水温が関与した可能性は低いと考えられる。

魚類には機能的雌雄同体(一生の間に正常に雄および雌の双方として成熟し生殖する)を示す種が存在し, それらの魚では正常な生理学的メカニズムのもとで性転換を行う (中村ら, 2006; 小林, 2008)。しかし, 日本沿岸で精巣卵が見出された魚類はいずれも雌雄異体魚であることから, 精巣卵は異常な性転換の兆候とみなされる。

魚類の性転換に関する研究の歴史は古く, その実験手法として1930年代頃からメダカ *Oryzias latipes*, グッピー *Poecilia reticulata*, キンギョ *Carassius auratus*, ゼブラフィッシュ *Danio rerio*, ナイルティラピア *Oreochromis niloticus*等の淡水

魚を用いて性ホルモン投与による人為的性転換が行なわれている (Yamamoto, 1969; 高橋, 1978)。雄魚の雌化に用いられるホルモンとして, 天然エストロゲンであるエストロン, 17β -エストラジオール(E2), エストリオールの他, 合成エストロゲンのジェチルスチルベストロール, エチニルエストラジオール, スチルベストロール等があり, これらのホルモンの中でもE2が比較的多く用いられている (Hunter and Donaldson, 1983)。また, エストロゲン以外にもテストステロンやメチルテストステロンのようなアンドロゲンを高濃度で体内投与した場合にも遺伝的雄の雌化が生じる。例えば, 山本(1995)はヒラメを孵化後31日から100日まで $100\mu\text{g/L}$ メチルテストステロン海水に浸漬させると性比が雌に偏った。この結果は, 高濃度のアンドロゲンが体内で芳香化されエストロゲンに転換されることによる逆説的効果とされている (Nakamura, 1975; Piferrer and Donaldson, 1991; 山本, 1995)。一方, EEDCsのノニルフェノールやオクチルフェノールでは約 $10\mu\text{g/L}$ (Seki *et al.*, 2002), E2では約 30ng/L (Hirai *et al.*, 2006) というアンドロゲンに比べ著しく低い濃度の曝露でメダカの精巣に精巣卵を誘発することから, 海域で採取された雄魚に見出された精巣卵の形成にはEEDCsが関与した可能性が推察された。しかし, 日本の沿岸域におけるEEDCs影響の実態調査で精巣卵が見出された海産魚類を用いて, 精巣卵形成とEEDCsの関係を検討した報告はこれまでにない。

そこで, 本研究では海域で精巣卵の存在が確認された魚類のうち, 種苗生産技術が確立し, 仔稚魚期からの飼育実験が可能なシロギスを供試魚として, EEDCsの中でも過去の知見が多いE2の曝露飼育を行い, 海産魚類の精巣卵形成とEEDCsとの関係を調べた。

方 法

供試魚 新潟県柏崎市地先で釣獲したシロギスを親魚として, 水槽内の自然産卵によって得られた卵を孵化させ, 養成した稚魚を供試魚とした。養成期間中は餌料としてシオミズシボウムシ *Branchionus plicatilis*, アルテミア *Artemia salina*, 配合飼料 (海産魚用初期飼料2号 (株)ノーサン) を与えた。また, 飼育水槽内の飼育水の水質を良好に保つため, 孵化直後から孵化後30日まで, 植

物プランクトン (*Pavlova lutheri* および *Tetraselmis tetrathele*) を添加した。

試験条件 試験水槽として流水式のチタン製円形水槽 (500L: 海水流量360L/h) 4基を用意し、そのうちの3基には飼育水中のE2濃度が10, 30および100ng/Lの飼育水をそれぞれ注水し、残り1基にはE2助剤であるジメチルスルホオキシド (DMSO) 25mg/Lを注水し4試験区 (3濃度区, 1助剤対照区) とした。各試験区には孵化後30日 (9月6日) のシロギス稚魚400個体を収容し、流水条件で21日間、E2の曝露飼育を行った。曝露終了後各水槽には清浄海水を注水し、孵化後100日まで飼育を継続した。曝露期間中および曝露後の清浄海水飼育中の水温/日長条件は25℃/15L (4時30分点灯, 19時30分消灯, 光源は昼光色蛍光灯) とし、点灯および消灯前の照度は30分かけて徐々に変化させ薄明および薄暮の状態を模した。海水中E2濃度は、曝露期間中に3回、曝露終了後に1回、各濃度区の海水を採取し、「外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル (水質, 底質, 水生生物)」(環境庁水質保全局水質管理課, 1998) および「要調査項目等調査マニュアル (水質, 底質, 水生生物)」(環境省環境管理局水環境企画課, 2003) に準じてLC/MSにより測定した。餌は配合飼料 (海産魚用初期飼料2~5号, (株) ノーサン) を一日に体重 (直近の測定値) の2%の量を毎日与えた。

試料採取方法 孵化後30日の曝露開始前に50個体、孵化後51日 (E2曝露終了時) および孵化後75日 (清浄海水飼育中) に各区からそれぞれ50個体、孵化後100日 (試験終了時) に各区の生存個体のすべて (66~102個体/水槽) を取り上げて、過剰の4-アミノ安息香酸エチルで麻酔処理後、魚体全体をブアン氏液で固定した。各区とも固定された供試魚のうち30個体の体長と体重を測定した。孵化後30, 51, 75日の助剤対照区の一部の個体と孵化後

100日の助剤対照区およびE2曝露区のすべての個体について、生殖腺を含む体幹部全体をパラフィンに包埋し、常法により切片を作製し雌雄判定と組織観察を行った。

分析結果の統計処理 結果は平均値±標準誤差で示し、それらの平均値の差の検定はKruskal-Wallis検定およびDunnettの多重比較法を用いた。また、性比の偏りの検定は χ^2 検定を用いた。

結 果

水温, 塩分, pHおよびDO 孵化後30日から100日までの各水槽の水温は24.6~25.6℃, 塩分は32.3~33.8psu, pHは8.1~8.2, DOは97.0~101.8%の範囲内であった。

海水中E2濃度 E2曝露期間中および曝露終了後の海水中E2濃度を第1表に示した。曝露期間中はいずれの曝露区のE2濃度も設定値の93~107%で安定した値を保っていた。また、曝露終了後3日目には、E2濃度が検出下限値以下まで減衰していることが確認された。

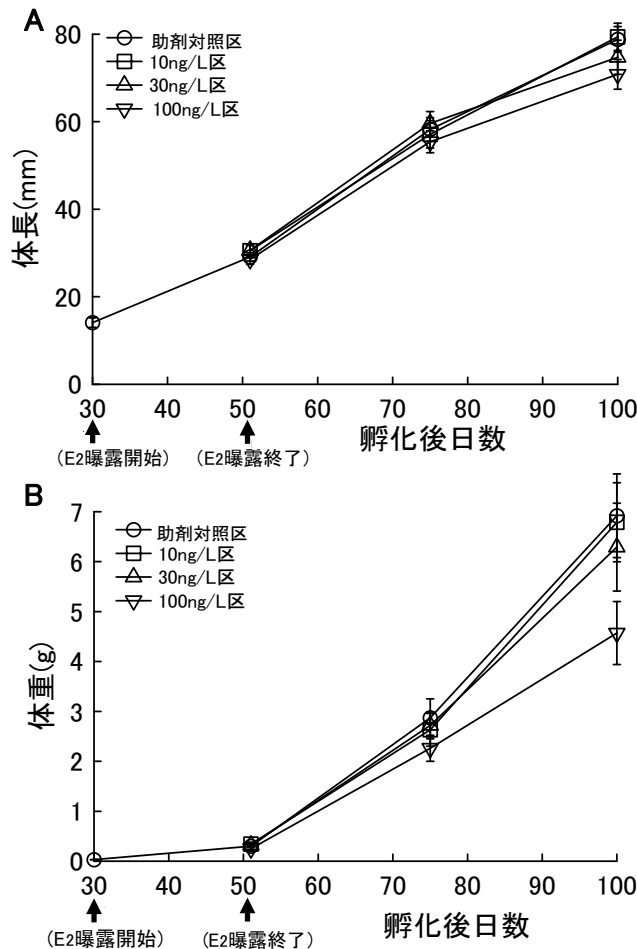
シロギスの体長と体重 孵化後30日から100日までの助剤対照区およびE2濃度区の供試魚の体長, 体重の変化をそれぞれ, 第1図A, Bに示した。孵化後30, 51, 75, 100日の助剤対照区の平均標準体長(平均体重)は, それぞれ15±0mm (0.03±0.00g), 29±1mm (0.30±0.03g), 58±3mm (2.9±0.4g), 79±3mm (6.9±0.8g)であった。いずれの採集日においても10~100ng/L区の体長および体重と助剤対照区のそれらの値との間に有意差はみられなかった。孵化後100日の100ng/L区の体重 (4.6±0.6g) は助剤対照区 (6.9±0.8g) に比べて低い傾向がみられたが, 有意差は認められなかった。

孵化後100日の雌雄別の体長と体重をそれぞれ, 第2図A, Bに示した。体長および体重については

第1表 E2曝露期間中および終了後の海水中E2濃度

設定区/E2曝露開始後日数	3日	10日	17日	24日 ^{*2}
助剤対照区	nd ^{*1}	nd	nd	nd
10ng/L区	10	10	10	nd
30ng/L区	29	28	32	nd
100ng/L区	98	95	95	nd

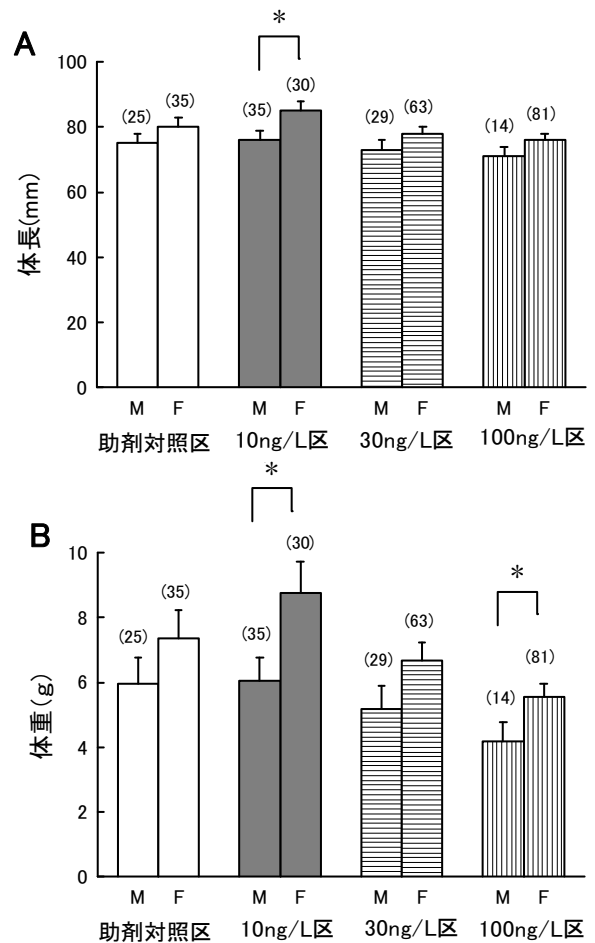
^{*1} 0.03ng/L未満, ^{*2} 曝露終了後3日



第1図 孵化後30日から100日までのシロギスの体長と体重の変化。A：体長，B：体重，各点の検体数は30個体，縦線は標準誤差。体長，体重はブアン固定後に測定。

各濃度区と助剤対照区との間で有意差は認められなかった。同じ濃度区の雌雄間の値を比較すると，10ng/L区の体長と体重および100ng/L区の体重では，雌の値が雄の値よりも有意に大きい値を示した ($P < 0.05$)。

生存個体数と性比 孵化後100日の生存個体数と性比を第2表に示した。孵化後100日の助剤対照，10ng/L，30ng/Lおよび100ng/L区の生存個体数は，それぞれ69，66，93および102個体で，そのうち生殖腺が未分化なシロギスが，それぞれ2，1，1，7個体含まれていた。助剤対照区および10ng/L区の生存個体数が他の濃度区に比べ少なかったが，その理由は，助剤対照区では孵化後30日頃に原因不明のへい死が発生したこと，10ng/L区では孵化後80日に試験水槽の残餌回収中に誤って供試魚を排水口から流出させてしまったことによる。



第2図 孵化後100日のシロギスの雌雄別の体長と体重。A：体長，B：体重，M：雄，F：雌。括弧内の数字は検体数，縦線は標準誤差。助剤対照区の雄と雌の生存個体数はそれぞれ28個体と39個体であったが，雄3個体と雌4個体の体長と体重が測定時欠測のため，助剤対照区の検体数が25個体と35個体となった。体長，体重はブアン固定後に測定。図中の米印(*)は有意水準5%で差が認められたことを示す。

孵化後100日の助剤対照，10ng/L，30ng/Lおよび100ng/L区の性比(♂/♀)は，それぞれ0.72，1.17，0.46および0.17で，30ng/L区と100ng/L区の性比は有意に雌に偏っていた ($P < 0.01$)。

助剤対照区の生殖腺組織 孵化後30日 (E2曝露開始日) には体腔背壁に始原生殖細胞を含む生殖隆起が形成され始めた時期にあり，生殖腺はまだ雌雄未分化であった (第3図A)。しかし，孵化後51日 (E2曝露終了日) には未分化生殖腺 (第3図B) に加え，卵巢腔形成を開始した卵巢組織像 (第3図C) も観察された。すなわち，以上の組織観察の結果は，本研究におけるE2曝露時期が生殖腺が未分化な発達段階から開始されたことを裏付けて

第2表 孵化後100日のシロギスの生存個体数と性比

設定区	♂(個体)	♀(個体)	♂+♀(個体)	未分化(個体)	♂/♀	χ^2 検定		
						χ^2	雌雄差	有意水準
助剤対照区	28	39	67	2	0.72	1.8	無	$P>0.05$
10ng/L区	35	30	65	1	1.17	0.4	無	$P>0.05$
30ng/L区	29	63	92	1	0.46	12	有	$P<0.01$
100ng/L区	14	81	95	7	0.17	47	有	$P<0.01$

いる。

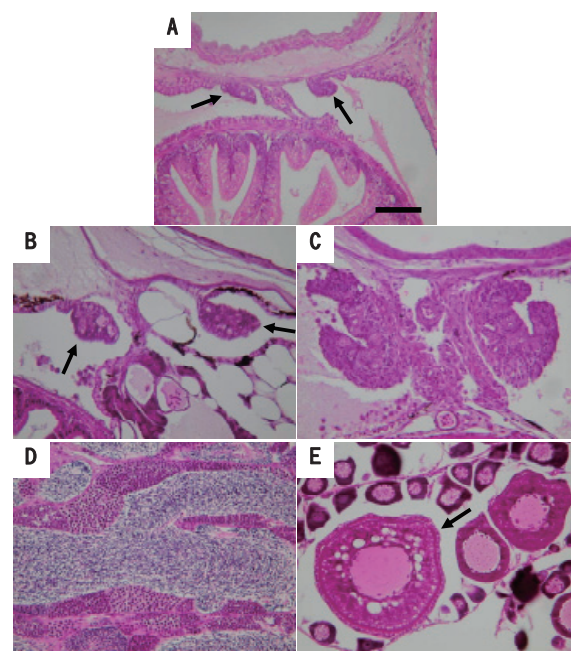
孵化後100日の助剤対照区の雄の精巣は、精子に至る各発達段階の生殖細胞で構成され、活発な精子形成像(第3図D)を示した。また、雌の卵巢は卵黄形成期の卵母細胞(第3図E)を含み成熟途上にあった。

E2曝露区の生殖腺組織 孵化後100日の10～100ng/L区の雄の精巣組織像は助剤対照区の雄の精巣と同様に、活発な精子形成像を示した(第4図A, C, E)。しかし、30ng/L区の雄29個体中1個体と100ng/L区の雄14個体中3個体から精巣卵が認められた(第5図A：30ng/L区雄，第5図B～D：100ng/L区雄)。

孵化後100日の10～100ng/L区の雌の卵巢はいずれも周辺任期までの卵母細胞で構成され未熟な様相を示したが、異常な組織像は認められなかった(第4図B, D, F)。

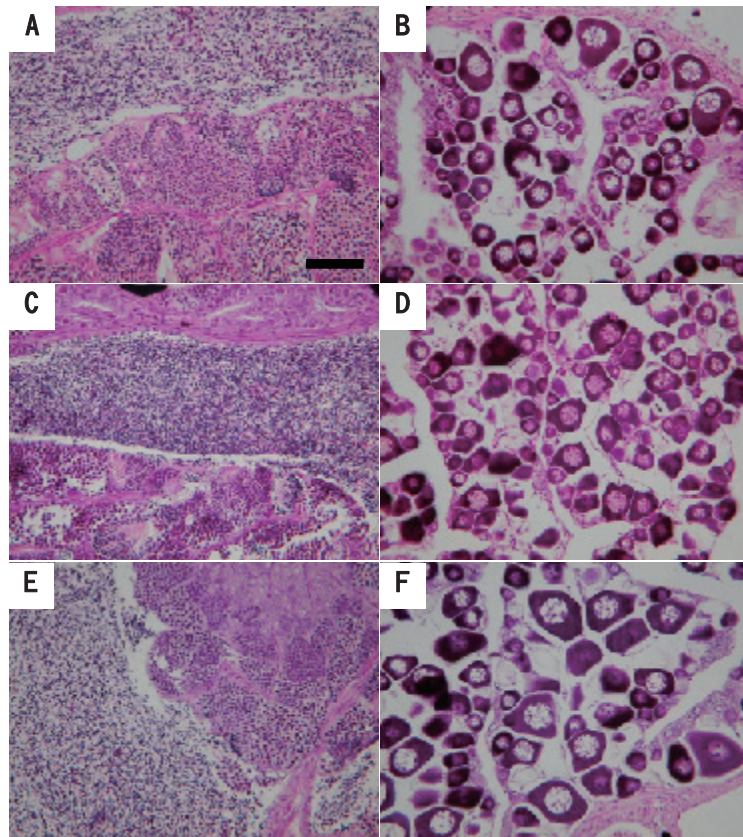
考 察

曝露時期の設定 性ホルモンによって遺伝的雄あるいは雌をそれぞれ機能的な雄と雌に性転換させるためには、生殖腺の形態的性分化開始以前からホルモン処理を始める必要がある(Yamamoto, 1969)。シロギスは体長約25mmでそれまで未分化だった生殖腺は卵巢へ分化する(堀田ら，未公表)ことから、シロギスの性分化に及ぼすE2曝露の影響を調べるためには、体長25mm以前に曝露を開始する必要があると考えられた。そこで本実験では、雌への形態的性分化が始まる以前の体長15mmのシロギスを用いてE2曝露を行った。その結果、30ng/L区と100ng/L区の性比(♂/♀)はそれぞれ0.46, 0.17と有意に雌に偏った。助剤対照区と10ng/L区の性比が1前後であったことから、30ng/L区と100ng/L区の雌の中には、遺伝的雄がE2曝露により雌化した個体が含まれていると考えられた。

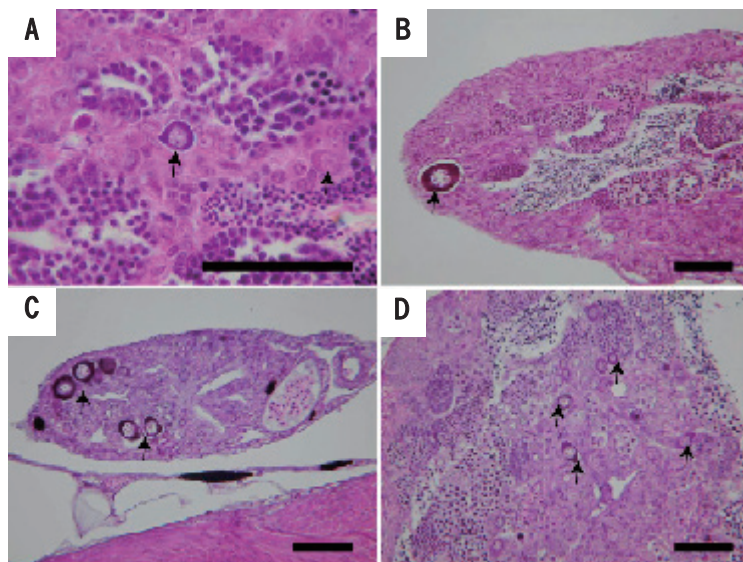


第3図 助剤対照区のシロギスの生殖腺組織像。A：孵化後30日未分化生殖腺，B：孵化後51日未分化生殖腺，C：孵化後51日卵巢，D：孵化後100日精巣，E：孵化後100日卵巢，AとBの図中の矢印は未分化生殖腺を，Eの図中の矢印は卵黄形成期の卵母細胞を示す。バーは50 μ mを示す(A～E共通)。

曝露期間中の供試魚減耗の影響 助剤対照区はへい死により、10ng/L区は流失させてしまったことにより、それらの区の孵化後100日の生存個体数は、30ng/L区や100ng/L区に比べ約30%少なかった。もし助剤対照区あるいは10ng/L区での供試魚の減耗が雄に選択的に起きたとすると、助剤対照区あるいは10ng/L区の孵化後100日の性比は有意に雌に偏ることになる。Hirai *et al.* (2006)はメダカを受精卵から孵化後20日までE2の設定濃度30ng/L(実測値33.5ng/L)でE2曝露したところ、孵化後14日以降に精巣卵の形成を確認しており、それ以下のE2濃度では精巣卵は形成されなかったことから、本実験結果はHirai *et al.* (2006)



第4図 孵化後100日の各E2濃度区の生殖腺組織像。A：10ng/L区精巣，B：10ng/L区卵巢，C：30ng/L区精巣，D：30ng/L区卵巢，E：100ng/L区精巣，F：100ng/L区卵巢，バーは50 μ mを示す(A～F共通)。



第5図 孵化後100日の各E2濃度区のシロギス雄の精巣に観察された精巣卵。Aは30ng/L区の雄1個体の精巣に観察された精巣卵(矢印)，B～Dは100ng/L区雄3個体のそれぞれの精巣組織に観察された精巣卵(矢印)。バーは505 μ mを示す。

の報告と一致する。また, Brion *et al.* (2004)は, ゼブラフィッシュを供試材料として, 孵化直後から孵化後21日までの仔魚(生殖腺未分化), 孵化後21日から42日までの稚魚(生殖腺の性分化期), 成魚(孵化後200日以降)の異なる成長段階で, それぞれ海水中濃度5, 25, 100ng/L(実測値はそれぞれ4.6, 22, 117ng/L)の3段階のE2に3週間曝露した。その結果, 生殖腺の分化が開始する前の仔魚期にE2曝露された場合のみ, E2濃度に依存して性比が雌に偏り100ng/Lでは有意に高かった, と報告しているが, ゼブラフィッシュにおいてもE2 5ng/L区や25ng/L区での性比の偏りは確認されていない。以上より, 本実験において10ng/L区で性比の変動や精巣卵形成が見られなかったことは過去の知見に沿った結果であり, 助剤対照区や10ng/L区における供試魚の減耗は, 孵化後100日の性比に大きな影響を及ぼさなかったと判断される。

卵巣の発達に及ぼすエストロゲン曝露の影響 10～100ng/LのE2曝露区のシロギス雌の卵巣の卵母細胞は周辺仁期までの発達段階に留まり, 卵黄形成期には至らなかった。卵黄形成期以降の卵母細胞の発達には脳下垂体から分泌される生殖腺刺激ホルモン(以下GTH)の存在が不可欠である一方, 周辺仁期の雌の脳下垂体を手術により除去しても卵は退行変性を起さないことから周辺仁期の卵母細胞はGTHの支配は受けないことが示されている(会田, 1989)。一般に脊椎動物において, 外部から過剰量の性ホルモンを投与すると, 生殖腺が退縮する場合があります, この現象は性ホルモンの負のフィードバック作用により脳下垂体からの生殖腺刺激ホルモン分泌が強く抑制されるためと考えられている(小林・足立, 2002)。Maack and Segner (2004)は, 性分化期のゼブラフィッシュを用いて, エチニルエストラジオール(EE2)の水中濃度が10ng/Lとなるように曝露しながら28日間飼育した後, EE2曝露を止めて清浄水で飼育したところ, EE2曝露群の産卵開始日は孵化後160日で, 無曝露群の産卵開始日の孵化後137日に比べ遅くなったことを報告している。本実験において, シロギス雌ではE2曝露により血中にE2が濃縮され, E2濃度が急激に上昇した結果, E2による負のフィードバックが働き脳下垂体からのGTH分泌が抑制され, その結果として卵巣の卵母細胞の成熟段階が周辺仁期に留まったと考えら

れる。一方, Maack and Segner (2004)の結果から稚魚期の雌魚におけるエストロゲン曝露の影響は可逆的とみられ, 本実験においてE2曝露中止後の清浄海水飼育を孵化後100日以降も継続していれば, シロギス雌の卵巣の発達は再開したと推察されるが, この点については今後の確認が必要である。

海域におけるEEDCs曝露の可能性 日本沿岸の港湾内や湾奥, 河口などの海水を, 培養細胞を用いてエストロゲン活性を測定すると, E2等量で数～数十ng/L, また, GC-MSを用いた機器分析によりエストロン(E1)やE2を測定すると, その十分の一の濃度レベルで検出される(Kawai *et al.*, 2002; Ohkubo *et al.*, 2003; 和波ら, 2004)。概して日本沿岸海域のEEDCs濃度レベルは, 一部の閉鎖海域や河川河口を除いてシロギスの精巣に精巣卵を誘発する濃度(E2で30ng/L程度)より低いと言ってよいであろう。しかし, 海域によってはE2以外にもE1, ノニルフェノール, ビスフェノールA等の複数のEEDCsが検出されている。例えば, 中田・高田(2006)は, 東京湾湾口の海水でE1, E2, ノニルフェノール, ビスフェノールA, オクチルフェノールを測定したところ, それぞれ, <0.01～1.7ng/L, 0.2～1.1ng/L, 2～20ng/L, 0.8～11ng/L, 0.2～2ng/Lの濃度範囲で検出された。Sumpter and Jobling (1995)は, ニジマス肝細胞を用いた*in vitro*のEEDCs曝露実験を行い, EEDCsの5物質を単独に投与した場合のそれぞれのビテロゲニン産生量と5物質を混合して1度で投与した場合のビテロゲニン産生量を比較したところ, 混合投与時のビテロゲニン産生量が単独投与の産生量の合計の2倍近くになったことから, EEDCsの複合影響によりエストロゲン作用が増幅されることを示した。したがって, 海域のEEDCsの各物質の濃度が, 例えば, 中田・高田(2006)が報告しているような比較的低レベルであっても, 複数のEEDCsが共存するならばシロギスの精巣に精巣卵を誘発する可能性は十分に考えられる。上記の知見を考慮した上で, 海域のシロギスにおける精巣卵の形成過程について次のように推察する。すなわち, シロギスは生殖腺の未分化な時期を含む稚魚期に, 複数のEEDCsが共存する沿岸近くの水域に少なくとも3週間程度来遊すると, EEDCsの複合影響により性分化後の稚魚の精巣に精巣卵が形成される可能性がある。また, 精巣卵は一度形成

されると長期に残存することから (Gronen *et al.*, 1999; Seki *et al.*, 2002), 精巣卵は成魚においても発見される可能性が十分高いと考えられる。

性分化期のシロギスを複数のEEDCs共存下で飼育して性比や精巣卵の頻度を調べることは, 上記仮説の有力な検証方法の1つであり, 今後実施されることが望まれる。

謝 辞

この論文は, 独立行政法人水産総合研究センターから委託された広域レベル漁場環境保全方策検討委託事業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る。

引用文献

- 会田勝美 (1989). 成熟・産卵の内分泌支配. 「水族繁殖学」(隆島史夫・羽生 功編), 緑書房, 東京, 65-102.
- Goto, R., Mori, T., Kawamata, K., Matsubara, T., Mizuno, S., Adachi, S. and Yamauchi, K. (1999). Effects of temperature on gonadal sex determination in barfin flounder *Verasper moseri*. *Fisheries Sci.*, **65**, 884-887.
- Goto, R., Kayaba, T., Adachi, S. and Yamauchi, K. (2000). Effects of temperature on sex determination in marbled sole *Limanda yokohamae*. *Fisheries Sci.*, **66**, 400-402.
- Gronen, S., Denslow, N., Manning, S., Barnes, S., Barnes, D. and Brouwer, M. (1999). Serum vitellogenin levels and reproductive impairment of male Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 4-tert-octylphenol. *Environ. Health Perspect.*, **107**, 385-390.
- 原 彰彦 (2013). 魚類の卵形成たんぱく質に関する免疫生化学的研究. 日水誌, **79**, 300-310.
- 橋本伸哉 (2000). 環境ホルモンの海産魚類に対する影響—東京湾産マコガレイを例として—. 沿岸海洋研究, **37**, 85-88.
- Hirai, N., Nanba, A., Koshio, M., Kondo, T., Morita, M. and Tatarazako, N. (2006). Feminization of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 17 β -estradiol: Formation of testis-ova and sex-transformation during early-ontogeny.

Aquat. Toxicol., **77**, 78-86.

- 堀田公明・渡辺剛幸・岸田智穂・眞道幸司・三浦正治・中村幸雄・足立伸次・大久保信幸・松原孝博 (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, 173.
- Hunter, G.A. and Donaldson, E.M. (1983). Hormonal sex control and its application to fish culture. *In* “Fish physiology” (eds. Hoar, D.J., Randall, D.J. and Donaldson, E.M.), Vol. IX, Academic Press, London, 223-303.
- 飯島憲章・植松一眞・下川真理子・石井裕子・大嶋雄治・藤井一則・橋本伸哉・原 彰彦・山田 久 (2001). 瀬戸内海周防灘及び広島湾のマコガレイに対するエストロジェン様内分泌攪乱物質の影響実態. 環境毒性学会誌, **4**, 45-53.
- 環境庁水質保全局水質管理課 (1998). 外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル(水質, 底質, 水産生物). <http://www.env.go.jp/chemi/end/sympo/manual199810/water.html> (2015年1月アクセス)
- 環境省環境管理局水環境企画課 (2003). 要調査項目等調査マニュアル(水質, 底質, 水生生物). <https://www.env.go.jp/water/chosa/h15-03.pdf> (2015年1月アクセス)
- Kawai, S., Kurokawa, Y., Matsuoka, S., Nakatsukuri, M. and Miyazaki, N. (2002). Estrogenic substances in the surface seawater collected from Otsuchi Bay, Yamada Bay and Ofunato Bay, Iwate Prefecture. *Otsuchi Marine Science*, **27**, 28-32.
- Kitano, T., Takamune, K., Kobayashi, T., Nagahama, Y. and Abe, S. (1999). Suppression of P450 aromatase gene expression in sex-reversed males produced by rearing genetically female larvae at a high water temperature during a period of sex differentiation in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *J. Mol. Endocrinol.*, **23**, 167-176.
- Kleinkauf, A., Scott, A.P., Stewart, C., Simpson, M.G. and Leah, R.T. (2004). Abnormally elevated VTG concentrations in flounder (*Platichthys flesus*) from the Mersey Estuary (UK) – a continuing problem. *Ecotox. environ.*

- safe., **58**, 356-364.
- 小林牧人・足立伸次 (2002). 生殖. 「魚類生理学の基礎」(会田勝美編), 恒星社厚生閣, 東京, 155-184.
- 小林 亨 (2008). 魚類の生殖腺性分化機構研究の現状. 水研センター研報, **No. 24**, 107-114.
- Maack, G. and Segner, H. (2004). Life-stage-dependent sensitivity of zebrafish (*Danio rerio*) to estrogen exposure. *Comp. Biochem. Physiol. C*, **139**, 47-55.
- Nakamura, M. (1975). Dosage-dependent changes in the effect of oral administration of methyltestosterone on gonadal sex differentiation in *Tilapia mossambica*. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*, **26**, 99-108.
- 中村 将・小林靖尚・三浦さゆり (2006). サンゴ礁魚類の性分化, 性転換機構の形態学的, 生理学的研究. 水研センター研報 別冊 **No. 4**, 19-25.
- 中田典秀・高田秀重 (2006). エストロゲン様内分泌かく乱物質の分布・動態-東京湾. 「環境ホルモナー水産生物に対する影響実態と作用機構-」(「環境ホルモナー水産生物に対する影響実態と作用機構」編集委員会編), 恒星社厚生閣, 東京, 19-39.
- Ohkubo, N., Mochida, K., Adachi, S., Hara, A., Hotta, K., Nakamura, Y. and Matsubara, T. (2003). Estrogenic activity in coastal areas around Japan evaluated by measuring male serum vitellogenins in Japanese common goby *Acanthogobius flavimanus*. *Fisheries Sci.*, **69**, 1135-1145.
- Omoto, N., Koya, Y., Chin, B., Yamashita, Y., Nakagawa, M. and Noda, T. (2010). Gonadal sex differentiation and effect of rearing temperature on sex ratio in black rockfish (*Sebastes schlegeli*). *Ichthyol. Res.*, **57**, 133-138.
- Piferrer, F. and Donadlson, E.M. (1991). Dosage-dependent differences in the effect of aromatizable and nonaromatizable androgens on the resulting phenotype of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Fish Physiol. Biochem.*, **9**, 145-150.
- Seki, M., Yokota, H., Maeda, M., Tadokoro, H. and Kobayashi, K. (2002). Effects of 4-nonylphenol and 4-tert-octylphenol on sex differentiation and vitellogenin induction in medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Toxicol. Chem.*, **22**, 1507-1516.
- Sumpter, J.P. and Jobling, S. (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ. Health Persp.*, **103**, 173-178.
- 高橋裕哉 (1978). 性の分化と性転換. 「ホルモンと生殖 I」(日本比較内分泌学会編), 学会出版センター, 東京, 23-58.
- 和波一夫・嶋津暉之・宮下・雄博・大原 拓 (2003). 都内水域の環境ホルモンに関する研究 (その1) - 東京都内湾の魚類調査 -. 東京環境科研年報 2003, 55-62
- 和波一夫・嶋津暉之・宮下雄博・山本俊光・塚田和秀・吉岡 大輝 (2004). 都内水域の環境ホルモンに関する研究 (その3) - 東京都内湾の魚類の生殖異変とエストロゲンの流入負荷量 -. 東京環境科研年報 2004, 101-109.
- 和波一夫・竹内 健・宮下雄博 (2005). 都内水域の環境ホルモンに関する研究 (その4) - 東京都湾に生息する魚類の精巣卵とボラのビテロゲニン -. 東京環境科研年報 2005, 158-165.
- 山本英一 (1995). ヒラメの人為的性統御とクローン集団作出に関する研究. 鳥取水試報告, **No. 34**, 1-145.
- Yamamoto, T. (1962). Hormonic factors affecting gonadal sex differentiation in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* **1** (Suppl.), 341-345.
- Yamamoto, T. (1969). Sex differentiation. In "Fish Physiology" (eds. Hoar, W.S. and Randall, D.J.), Vol. III, Academic Press, New York, 150-152.