

コイ雌の血中エストロゲン量に対するストレスホルモンの影響についての予備的検討

¹飯島啓 ¹柴田安司 ²野津了 ²中村將 ^{1, 3, 4}平井俊朗

¹帝京科学大学大学院理工学研究科バイオサイエンス専攻

²沖縄美ら島財団総合研究センター

³岩手大学農学部食料生産環境学科

⁴岩手大学三陸水産研究センター

A preliminary investigation of the effects of stress hormones on estrogen levels in maturing female Koi carp

Kei IJIMA Yasushi SHIBATA Ryo NOZU Masaru NAKAMURA Toshiaki HIRAI

Keywords: Koi carp, ovary, estrogen, ELISA, cortisol, stress

1. はじめに

脊椎動物では、雌雄異体性の生殖様式を取るものが大半を占めており、発生過程の特定の時期に生殖腺をはじめとする体の各部に性差が現れる。このことを性分化と呼ぶ。これに先立ち、将来どちらの性別へと分化するかという運命が決められることを性決定と呼ぶ。哺乳類や鳥類では、性別は通常、遺伝子型（性決定遺伝子の有無やコピー数）による支配を大きく受けて実際の性別が分化する。これに対して、両生類や魚類では性決定遺伝子が存在していてもその支配は絶対的ではなく、発生時の体内のホルモン環境によって実際の性別が分化し、それは体内のエストロゲン合成と密接に関連していることが知られている。

爬虫類や魚類の一部では、温度などの環境要因が性分化に大きく影響することが知られており、いくつかの魚種では通常生息温度よりも高い水温により遺伝的雌の雄化が誘導されることが報告されている¹⁻⁵⁾。メダカではその機構について詳細に検討されており、高温処理により体内でストレスホルモンの一種であるコルチゾールが上昇し、それがエストロゲン合成の鍵酵素であるアロマターゼの遺伝子 (*cyp19a 1*) 発現を阻害することで生殖細胞の増殖が抑制され、雄化が引き起こされることが報告されている²⁾。また、コルチゾールの長期間投与により、ニジマス⁶⁾、オオチョウザメ⁷⁾、ミツボシキユウセン⁸⁾でも血中エストラジオール (E2) レベルを低下させることが報告されている。このことからコルチゾールがエストロゲン産生の調節において直接および/または間接的役割を果たすことが示唆されている。

水産業の対象となる魚種の中には、雌雄どちらか

に優先的な商業価値があるものがある。これらの魚種を対象とした養殖業では商業価値の高い片方の性別だけを優先的に生産する「性統御技術」が生産効率の向上のために有効である。性統御技術には幾つかの方法が存在するが、大きくは染色体工学と内分泌制御とに分けることが出来る。前者は卵または精子のどちらか片方のゲノムを人工的に倍化させることで単為発生を行なわせて、遺伝的に片方の性別のみの個体群を生産する。一方、後者は発生過程における体内のホルモン環境を薬剤や環境要因などによって制御し、片方の性別への分化を優先的に誘導する方法である。

ニシキゴイは生物学的には通常のコイ (マゴイ) *Cyprinus carpio* と同一であるが、水産学的には観賞魚として独自の発展を遂げてきており、現在に至るまでに国内の養殖業者による絶え間ない育種の努力によって100余りの品種を数えるに至っている⁹⁾。ニシキゴイの商品価値は模様と体型によるところが大きく、大型でふくよかな体型が好まれ、このような体型は成熟雌個体で優先的に現れることから、養殖業界では雌を選択的に生産する方法の開発が望まれている。

コイ養殖において、内分泌制御による性統御は、食用マゴイを中心として研究されてきた¹⁰⁾。遺伝的雌 (XX) に雄性ホルモンや雌性ホルモン合成阻害剤の投与によって遺伝的雌を雄化させ、得られた性転換個体 (偽雄: XX) と通常雌 (XX) を交配して遺伝的全雌群を生産することに成功している。しかしこれらの研究でも処理条件 (投与濃度、投与時期・期間など) によって不妊化や精巢奇形が発生するなど、完全に機能的な偽雄の生産効率が安定していな

かった。われわれは新潟県内水面水産試験場との共同により、安定的に偽雄を生産できる処理条件を明らかにしたが¹¹⁾、薬剤を用いる方法は生産業者への普及の点で問題が残されている。一方、温度ストレスによる偽雄生産技術の水産業への応用例はヒメマスなどまだわずかであるが¹²⁾、ニシキゴイに適用できれば、これらの問題点を回避できる。

われわれは高温処理によるニシキゴイ遺伝的雌(XX)の雄化の可能性について検討するために、まず高温処理に対するストレス応答を仲介すると考えられる副腎皮質ホルモン、コルチゾールを経口(給餌)投与することで生殖腺性分化への影響を調査した。その結果、高濃度(1 mg/g 餌)のコルチゾールの継続投与によって高率で雌生殖腺の性転換(精巢化)が誘導されることが明らかとなった。また、この効果は体長が大きい処理区の個体ほど低下しており、体成長に伴うコルチゾール感受性の低下がうかがわれた。一方、高温飼育区(36℃)では発達した卵母細胞を持つ個体は少数であったが、明確な精巢化の所見を示す個体は確認されなかった。

そこで本研究ではコイにおけるコルチゾール投与による精巢化の機構を明らかにするための予備的検討として、性分化期と比較しエストロゲン合成量はるかに高く、魚体が大型のため連続採血が容易な成熟途上の雌個体を使用して、コルチゾールがエストロゲン合成の低下を誘導しうるか検証した。

2. 材料と方法

生命倫理についての配慮

本研究は本学動物委員会の審査・承認を経て行われた。実験動物の飼育ならびに屠殺に際しては、本学動物実験指針ならびに関係法令に準拠して、生命倫理に配慮した。

供試魚

新潟県内水面水産試験場にて生産された孵化後約40ヶ月の遺伝的全雌ニシキゴイ(体重230~531 g)を使用した。実験魚の配分の際には、実験区間での体長の偏りが最小になるように留意した。新潟県内水面水産試験場から本学水生動物室ならびに恒温実験室内の水槽に移入・馴致後、適宜実験に使用した。飼育室の設定室温は25℃、通常水温飼育水槽の水温はおおよそ23℃で、12時間明期12時間暗期の光周期の下で飼育した。供試魚は個体間の相互影響やサンプリング時の作業による影響を最小にするため、供試魚を1尾ずつ60 cm水槽(55 L)に収容し、3

日ごとに換水、濾過フィルター洗浄を行った。

薬剤投与

実験区は、以下の通りに設定した。対照区として、コルチゾールを含まない飼料を与え続けた通常餌飼育区(実験区1)、陽性対照区として、アロマターゼ阻害剤(雌性ホルモン合成阻害剤)であるエキセメスタン1.0 mg/g添加餌区(実験区2)を設定した。ストレスホルモン投与区として、コルチゾール0.1 mg/g添加餌区(実験区3)、コルチゾール1.0 mg/g添加餌区(実験区4)、コルチコステロン1.0 mg/g添加餌区を設定した(実験区5)。

孵化後約40ヶ月から各区に3尾を設定し、1ヶ月間処理を行った。薬剤投与は供試薬剤を含浸させた餌による経口投与により行った。給餌は1日2回、1回あたり1.5 g程度与えた。鯉低水温用浮き餌F-3(日清丸紅飼料株式会社)に各薬剤を添加し、添加餌として対象に経口投与で処理を行った。コルチゾール(ヒドロコルチゾン)およびコルチコステロン(東京化成工業株式会社)は最終濃度になるように秤量し、エタノール(日本アルコール株式会社)を加え溶解させた。この溶液をまんべんなくかけ、餌全体が浸るようにエタノールを足し含浸させ、45℃の乾燥機中で一日静置乾燥させた。乾燥後、餌を均一に混ぜた。アロマターゼ阻害剤については、エキセメスタン錠25 mg[NK](日本化薬株式会社)を最終濃度になるように必要錠数を容器に取り、70%エタノールを加えて錠剤を崩壊させた後、エタノールを追加して主剤を溶解させた(エタノール不溶性の添加剤は懸濁状態のまま)。この溶液を上述のように含浸、乾燥させた。

組織観察

最終採血の後に鰓蓋の後端部で断頭し、開腹、消化器系を除去し、生殖腺の状況を撮影した。ブアン固定液(飽和ピクリン酸:ホルムアルデヒド:酢酸=15:5:1)に魚体ごと浸漬し、一晚振とうさせ、固定液を浸透させた。その後、そのまま室温にて保存した。左右半身を分離後、固定生殖腺の外部形態を撮影し、生殖腺を傷つけないように注意しながら、どちらかの半身を体腎膨大部分の頭部側と尾部側で横断したのち、生殖腺と体腎を体腔上皮膜ごと筋組織から分離した。余分な組織(体腎など)をできる限り切除し、整形した。本作業中は、組織の乾燥を防ぐため時折、組織をブアン固定液に浸した。細切した組織片はブアン固定液に浸漬して包埋まで保存

した。

組織片から余分な体腎組織をさらに切除しサンプルを常法に従いパラフィン（パラプラスト；ライカ社）にて包埋した。作製されたパラフィンブロックは5 μ m厚に薄切し、HE染色に供した。染色にはマイヤー・ヘマトキシリン溶液（武藤化学社）と、1%エオシンY溶液（武藤化学社）に0.1%（v/v）になるように酢酸を加えたものを用いた。卵母細胞の発達段階を小川ら¹³⁾、山本ら¹⁴⁾、会田¹⁵⁾の報告をもとに、PN: 周辺仁期（peri-nucleolus stage）を周辺仁期（前期）卵母細胞（PN 1）と周辺仁期（後期）卵母細胞（PN 2）、YV: 卵黄胞期（yolk vesicle stage）、YG: 卵黄球期（yolk globule stage）を第一次（YG 1）、二次（YG 2）、三次（YG 3）に分類した。

エストラジオール（E 2）濃度測定（ELISA 法）

2-フェノキシエタノール（和光純薬）にて麻酔した後、1 mL シリンジ（テルモ）に18 G \times 1 1/2 注射針を装着し、尾柄部腹側より挿入し、腹大動脈より約1 mL 採血した。採血後、実験魚を飼育水槽に戻し、回復させた。採取した血液は1.5 mL 遠心管内で室温にて終夜静置後、微量高速遠心分離機（MC-150；トミー精工）により15,000 回転/分、10 分間遠心分離を行い、血清を分離した。血清を1.5 mL 遠心管に回収後、ホルモン濃度分析まで-80℃フリーザーにて保管した。

血清中に含まれるステロイドホルモンはジエチルエーテル（和光純薬）を用いて抽出した。シリコンコートした試験管に、試料とその10倍量のジエチルエーテルを入れ、ボルテックスで30秒間攪拌した後、エーテル層と水槽が完全に分離するまで数分間静置した。その後、冷却装置を用いて-30℃に冷却したメチルアルコールに試験管を浸して試料層（水層）を凍結させ、ステロイドホルモンを含むエーテル画分のみをシリコンコートした別の試験管に移した。この操作を3回繰り返し、回収したエーテルを遠心濃縮機（CC-105；トミー精工）にて揮発させ、蒸発乾固した。試験管内の抽出物を試料と同量の0.05 M ホウ酸緩衝液（0.5%ウシ血清アルブミン，pH 7.8）で再溶解し測定試料として用いた。

血中E 2量を第二抗体固相法 - 酵素免疫測定法（ELISA 法）により測定した。測定に使用した96穴のマイクロタイタープレートへの第二抗体（抗ウサギIgG ヤギIgG；Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc, USA）の固相化は次の手順で行った。

0.05% アジ化ナトリウムを含む0.05 M 炭酸緩衝液（pH 9.4）により希釈した第二抗体を1穴に100 μ L ずつ分注した。4℃で2日間放置した後、プレートを0.85% NaCl で5回洗浄し、4℃で乾燥させた。作製した測定用96穴マイクロタイタープレートに、測定試料、標識抗原（E 2: FKA 235；コスモ・バイオ社）、抗体（E 2: FKA 236-E；コスモ・バイオ社）の順に50 μ L ずつ加え、4℃で一晩インキュベートした。インキュベート終了後、全ての液を捨て、プレートウォッシャー（Intelispeed Washer IW-8；Biosan Ltd., Riga, Latvia）を用いて、0.85% NaCl（0.01% Tween20）で10回洗浄した。その後、発色液 [0.2 M クエン酸緩衝液 20 mL + *o*-フェニレンジアミン（Sigma-Aldrich Co. LLC, USA）1錠（10 mg）+ 0.01% H₂O₂] を150 μ L ずつ加え室温で20分間発色させた後6 N 硫酸を50 μ L ずつ加え発色を停止させた。その後マイクロプレートリーダー（xMark Microplate Spectrophotometer；Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA）を用いて492 nm における吸光度を測定した。試料中のステロイドホルモンは既知濃度のステロイドホルモン溶液の測定結果から算出した標準曲線により求めた。結合率50%近辺におけるプレート内およびプレート間の変動係数はそれぞれ8.5および1.2%であった。

統計解析

血中E 2量は平均値 \pm 標準偏差で表し、反復測定二元配置分散分析を行った。検定には統計解析ソフト R（version 3.3.2）を使用した。

3. 結果と考察

餌作成終了後の最終的なホルモン濃度は作成時の添加濃度とした。一方、餌摂取量の測定および摂取魚の血中ホルモン濃度の測定は行わなかった。3回の採血時における各実験区の体重を図1、2に示す。実験期間中を通して、実験区の間には有意な差は見られなかった。各個体の体重変動は図2のようになった。通常餌飼育（実験区1）、エキセメスタン1.0 mg/g 添加餌（実験区2）、コルチゾール0.1 mg/g 添加餌（実験区3）では、3個体すべてが試験期間を通じてほぼ一定の体重増加を示した。コルチゾール1.0 mg/g 添加餌（実験区4）の個体番号4-3では実験区1～3と同程度の体重増加が確認できたが、4-1および4-2ではほぼ横ばいであった。コルチコステロン1.0 mg/g 添加餌（実験区5）の個体番号5-1および5-3は緩やかな体重増加が確認でき、5-2

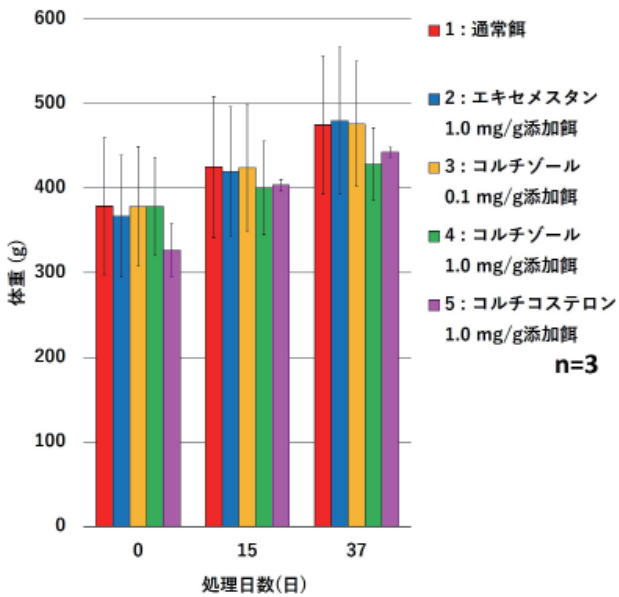


図1 各実験区の体重の推移
各実験区の体重の推移を平均値（棒線）と標準偏差（ヒゲ線）で示す。

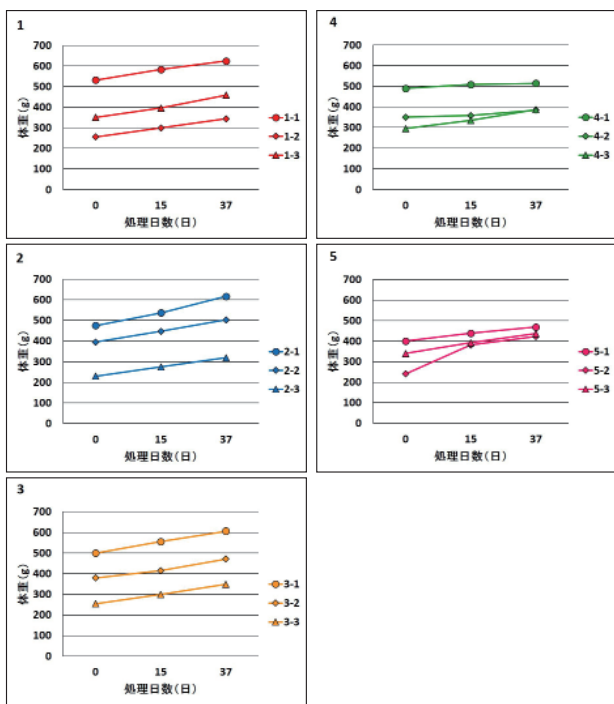


図2 各個体の体重の変動
実験区ごとに各個体の体重変動を示す。左上部の数字は実験区番号を、凡例は個体番号を示す。個体番号3-3（コルチゾール 0.1 mg/g）は処理開始当日に、4-2（コルチゾール 1.0 mg/g）は処理開始7日目に放卵した。

では処理15日目まで急激な体重増加がみられたが、その後は5-1、5-3同様に緩やかな体重増加が確認できた。なお、個体番号3-3（コルチゾール 0.1 mg/g）では処理開始時、個体番号4-2（コルチゾール 1.0 mg/g）では処理7日目に放卵が確認された

（補足表1）。補足図1に最終サンプリング時における各個体の生殖腺体指数（GSI：生殖腺重量×100/体重）を示す。各実験区ともに生殖腺の大型化が進んでいる個体（GSI 5.0以上）と進んでいない個体（GSI 2.0以下）が含まれており、実験区の間で差は見られなかった。

図3、4にE2濃度の各実験区における平均と個体別の変動を示す（各点のE2測定値は補足表2に示す）。平均値では全般的に処理15日目に上昇し、37日目に下降する傾向が見られたが、観察個体数が少なく、実験区内での測定値のバラツキが大きかったため、実験区の間で有意差は確認されなかった。実験区4および5の処理15日目におけるE2濃度平均値の顕著な上昇が見られたが、これは各1個体が突出した上昇を示したためである（後述）。唯一、処理15日目から37日目にかけて平均値の下降が見られなかった対照区（実験区1）でも、個体番号1-1のみで処理15日目に上昇したE2濃度が37日目にかけてさらに上昇しており、他の2個体ではわずかに下降していた（後述）。個体別の比較では、個体番号3-3（コルチゾール 0.1 mg/g）および4-1（コルチゾール 1.0 mg/g）は、処理開始時におけるE2濃度がそれぞれ1394.5 pg/mL、2153.5 pg/mLと他個体（48.5~405.5 pg/mL）と比べて高値を示した。3-3は実験期間を通して同様の高値を維持したが、4-1は実験終了時には他個体と同様の値まで低下した。処理15日目では、個体番号4-2（コルチゾール 1.0 mg/g）と5-1（コルチコステロン 1.0 mg/g）でE2濃度の急激な上昇が観察されたが（個体番号4-2：12718.4 pg/mL、5-1：8611.8 pg/mL）、実験終了時（処理37日目）には開始時と同様の値にまで低下した。処理37日目では、個体番号1-1（通常餌）、5-3（コルチコステロン 1.0 mg/g）以外は処理15日目よりE2濃度が低下し、個体番号1-1および3-3以外の個体では、550 pg/mL以下になった。

図5に実験終了時（処理37日目）の各個体の生殖腺組織像を示す。実験区1（通常餌）では、3個体中2個体（1-1、1-3）で卵黄球期、1個体（1-2）で卵黄胞期まで進行した卵母細胞が確認された。実験区2（エキセメスタン 1.0 mg/g）では、3個体中2個体（2-1、2-3）で卵黄球期、1個体（2-2）は周辺仁期まで進行した卵母細胞が確認された。実験区3（コルチゾール 0.1 mg/g）では、3個体中1個体（3-3）で卵黄球期、2個体（3-1、3-3）は周辺仁期まで進行した卵母細胞が確認された。実

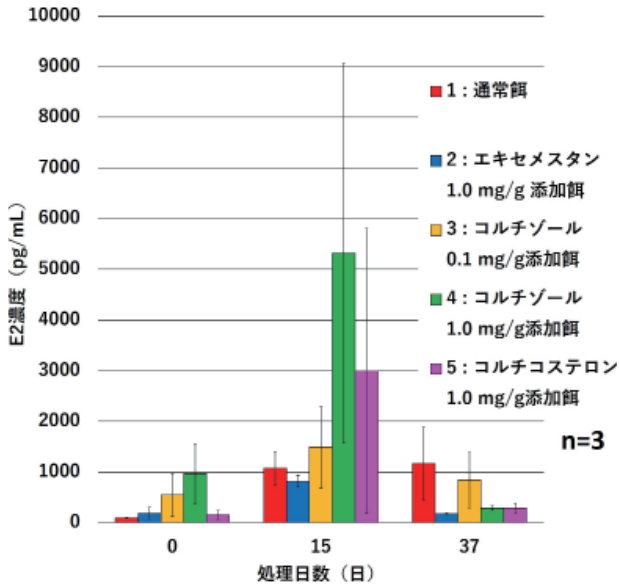


図3 各実験区のE2濃度の推移
各実験区のE2濃度の推移を平均値(棒線)と標準誤差(ヒゲ線)で示す。

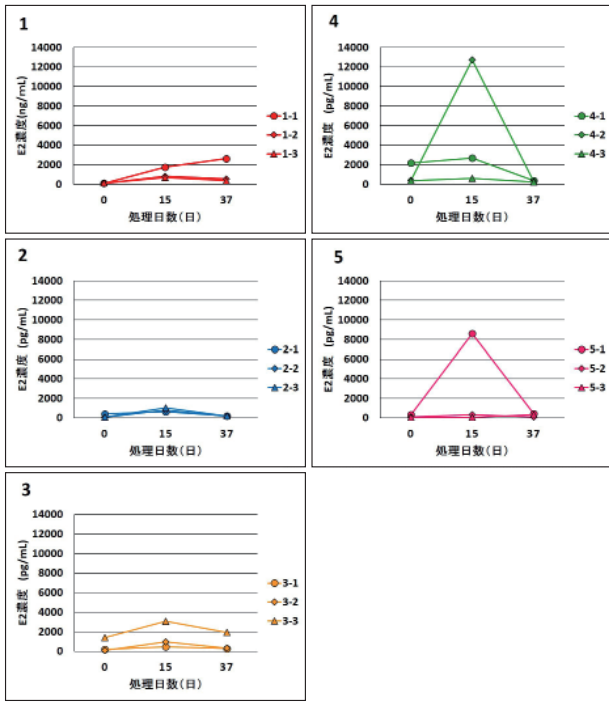


図4 各個体のE2濃度の変動
実験区ごとに各個体のE2濃度の変動を示す。左上部の数字は実験区番号を、凡例は個体番号を示す。

験区4(コルチゾール1.0 mg/g)では、3個体全てで卵黄球期まで進行した卵母細胞が確認された。実験区5(コルチコステロン1.0 mg/g)では、3個体中1個体(5-1)で卵黄球期、2個体(5-2、5-3)は周辺仁期まで進行した卵母細胞が確認された。実験期間中の平均成長速度(1日あたりの平均体重増加量)と卵母細胞の発達段階の関係(補足図2)

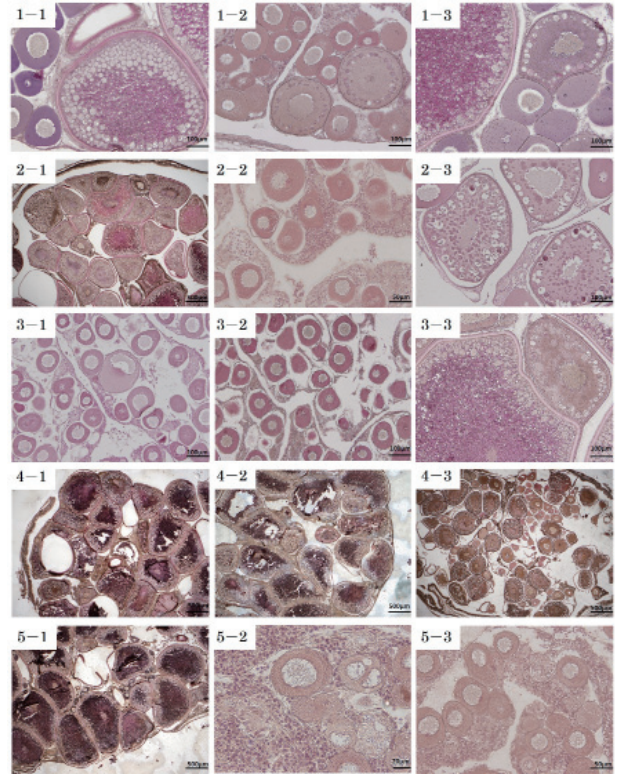


図5 実験終了時(処理37日目)の卵巣の組織像
各写真の左上の数字は個体番号を示す。スケールバーは直上に示す数値を示す。

では、卵母細胞の発達にもなって成長速度が低下する傾向が見られた。また、GSIとの関係(補足図3)では、卵黄球期への進行にもなってGSIの上昇が見られた。これらは従来、多くの魚種で示されている傾向と一致していた。

クッシング症候群では、慢性の糖質コルチコイド分泌過剰により、神経性食欲不振症が引き起こされることが知られている。本研究でもコルチゾール1.0 mg/g添加餌区の2個体(4-1、4-2)で0~37日の平均成長速度が低い傾向が見られた。この結果がコルチゾールの過剰投与による影響を示している可能性は否定できないが、本研究では実験期間中の血中コルチゾール濃度を測定していないため、結論を出すことはできない。一方、これらの個体は、GSIも6近くに達しており(補足図1)、卵母細胞が第二次卵黄球期まで進行していた(補足図2)。魚類では、卵黄形成が開始されて成熟が進行するにつれて、体成長の鈍化が生じることが知られている。したがって、これらの個体は実験開始時にすでに卵黄形成が進行していたために実験期間中の平均成長速度が低かった可能性が考えられる。

実験終了時(処理37日目)におけるE2濃度と卵巣発達との関係について検証した。GSIとの関係

(補足図4)では、GSI値が7前後の2個体(1-1、3-3)で高値となったが、同等以上のGSI値を示す個体の中には500 pg/mL以下のものもあった。一方、卵母細胞の発達段階との関係(補足図5)では、第二次卵黄球期以降へと進行した卵巣で高値を示す個体が見られ、この傾向は実験期間中全体のE2濃度最高値との関係(補足図6)において、より明確となった。つまりGSIとの関係において実験終了時のE2濃度が低値であった個体の多くはそれ以前にピークを迎えて、その後基礎レベルに戻っていたということである。

Vazirzadehら¹⁶⁾はカスピ海に生息するコイ雌の生殖周期にともなう性ステロイドの変動について報告している。それによると、時期との関係では翌年の産卵期に向けた卵黄形成期(10月~3月)にはE2濃度は高く(1000~1500 pg/mL)、その後、産卵期に向けて500 pg/mL以下に低下することが明らかとなっている。また、卵形成との関連では第二次から三次卵黄球期にかけての時期に最高値(1500 pg/mL程度)を迎え、その後、最終成熟期に向けて低下することが示されている。今回の結果は、概ねこれらの結果に合致しているが、個体番号4-2と5-1で、先行研究で報告されているE2濃度の最高レベルをはるかに超える高値が観察されたことについては、理由は不明である。

さらに、血中E2濃度最高値と体成長との関係について、2つの指標、平均成長速度(補足図7; 前述)および体重増加率(補足図8; $\{(\text{実験終了時体重} - \text{実験開始時体重}) / \text{実験終了時体重}\} \times 100$)に基づいて検証したところ、いずれにおいても体成長が抑えられている個体ほどE2濃度が高い傾向が見られ、組織学的解析による卵黄形成(個体の成熟)の進行と概ね合致していることが明らかとなった。

4. まとめ

本研究ではコイにおけるコルチゾール投与による精巢化の機構を明らかにするため、成熟途上の雌個体を使用して、コルチゾールがエストロゲン合成の低下を誘導しうるか検証した。しかし、生殖腺や血中E2濃度への明確な影響は確認できなかった。この理由として、各実験区の観察個体数が3尾と少なく、さらに実験開始時の卵巣の発達段階に予想よりも大きなバラツキがあったことが想定される。一方、陽性対照区として設定されたエキセメスタン投与によってもエストロゲン合成の明確な阻害が確認できなかったことから、血中E2濃度の基礎レベルが高

い成熟途上の雌では、そもそも37日間の投与では性転換を誘起できるほどの低下は引き起こせなかった可能性がある。従って、観察個体数を増やして、実験開始前の卵巣の発達状態を生検などにより確認した上で、より長期間の投与実験を再試行する必要がある。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、供試魚のご提供ならびに飼育実験の一部にご協力いただいた新潟県内水面水産試験場の職員各位に深く感謝致します。また、ご指導ご助言をいただいた共同研究者の皆様にご礼申し上げます。本研究は文部科学省科学研究費補助金(基盤研究C; 課題番号15K07588; 平井)の支援の下、実施されました。

補足資料

本研究の実験結果詳解のための補足資料(補足図1~8、補足表1, 2)を帝京科学大学学術リポジトリ <http://id.nii.ac.jp/1409/00000487/>に掲載する。

文献リスト

1. 山本栄一: 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*, 34: 1-143, 1995.
2. Y. Hayashi, H. Kobira, T. Yamaguchi, E. Shiraishi, T. Yazawa, T. Hirai, Y. Kamei and T. Kitano: High temperature causes masculinization of genetically female medaka by elevation of cortisol. *Mol. Reprod. Dev.*, 77: 679-686, 2010.
3. T. Yamaguchi, N. Yoshinaga, T. Yazawa, K. Gen and T. Kitano: Cortisol is involved in temperature-dependent sex determination in the Japanese flounder. *Endocrinology*, 151: 3900-3908, 2010.
4. T. Kitano, Y. Hayashi, E. Shiraishi and Y. Kamei: Estrogen rescues masculinization of genetically female medaka by exposure to cortisol or high temperature. *Mol. Reprod. Dev.*, 79: 719-726, 2012.
5. R.S. Hattori, J.I. Fernandino, A. Kishii, H. Kimura, T. Kinno, M. Oura, G.M. Somoza, M. Yokota, C.A. Strüssmann and S. Watanabe: Cortisol-induced masculinization: does thermal stress affect gonadal fate in pejerrey, a teleost fish with temperature-dependent sex determinati

- on? *PLoS One*, 4: e6548, 2009.
6. N.W. Pankhurst and G. Van der Kraak: Evidence that acute stress inhibits ovarian steroidogenesis in rainbow trout in vivo, through the action of cortisol. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 117: 225-237, 2000.
 7. S. Poursaeid, B. Falahatkar, B. Mojazi Amiri and G. Van Der Kraak: Effects of long-term cortisol treatments on gonadal development, sex steroids levels and ovarian cortisol content in cultured great sturgeon *Huso huso*. *Comp. Biochem. Phys. A.*, 163: 111-119, 2012.
 8. R. Nozu and M. Nakamura: Cortisol administration induces sex change from ovary to testis in the protogynous Wrasse, *Halichoeres trimaculatus*. *Sex. Dev.*, 9: 118-124, 2015.
 9. 星野ほか監修: 錦鯉問答, 東京, 新日本教育図書, 2007.
 10. 實松敦之, 渡辺博之: 17 α -メチルテストステロン投与処理による性転換雄の作出および性転換雄を用いたコイの全雌魚種苗生産, 福島水試研報, 6: 19-24, 2005.
 11. 兵藤則行: ニシキゴイの全雌生産技術の開発, 新潟内水試研報, 40: 20-21, 2016.
 12. 東照雄: 水温制御による安全かつ簡易なヒメマス全雌生産技術の開発, *Salmon 情報*, 1: 12-13, 2007.
 13. 小川智史, 佐藤将, 兵藤則行, 中村将, 平井俊朗: ニシキゴイの生殖腺発達過程に関する組織学的観察, 帝京科学大学紀要, 11: 61-75, 2015.
 14. 山本喜一郎, 大森正明, 山内皓平: 日本産ウナギ (*Anguilla japonica*) の卵形成について. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 40 (1) : 9-15, 1974.
 15. 会田勝美: 魚類生理学の基礎, 東京, 恒星社厚生閣, pp.161-164, 2002.
 16. A. Vazirzadeh, B. Mojazi Amiri and A. Fostier: Ovarian development and related changes in steroid hormones in female wild common carp (*Cyprinus carpio carpio*), from the southeastern Caspian Sea. *J. Anim. Physiol. An. N. (Berl)* ., 98 (6) :1060-1067, 2014.