

## 雌性誘導のためにヒラメに投与した エストラジオールの残留 [短 報]

柴田 輝和

### Residue of $\beta$ -Estradiol Administered Orally to Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus* in the Induction of Phenotypic Female.

Terukazu SHIBATA

人工飼育下でのヒラメの成長には雌雄差があり、雌が雄より成長が良いことが知られている<sup>1,2)</sup>。このため、ヒラメ養殖に雌種苗を導入することは、経営上有利になると考えられることから、近年、ヒラメ全雌種苗生産技術開発が盛んに行われている。ヒラメは雌性ホルモンであるエストラジオール- $17\beta$  (以下、 $E_2$ という)の経口投与や浸漬処理により雌化することが知られている<sup>3-7)</sup>。一方、食品中の $E_2$ の残留に関して、わが国では $E_2$ を含む天然ホルモンの残留について明確な基準はないが、近年のより安全な食品への関心の高まりを考慮すると、 $E_2$ の残留には問題がある。ヒラメでの $E_2$ の残留については、投与終了後3日以内で検出限界以下になるとの報告がある<sup>7)</sup>。今回、この報告とは異なった $E_2$ の投与条件での残留を調査したので、その結果を報告する。

供試魚は、1992年5月9日に天然親魚から人工採卵を行い、シオミズツボウムシ、アルテミアおよび魚肉ミンチで、日令64日まで養成した平均全長39.1mmのヒラメ稚魚を用いた。 $E_2$ の経口投与方法は、山田ら<sup>5)</sup>の方法に準じて行った。すなわち、供試魚を0.5t円形ポリエチレン製水槽4槽に、各700尾ずつ収容し、日令65日から124日までの60日間、ホルモン区の2水槽には $E_2$ を湿重量1g当たり1 $\mu$ g添加した魚肉ミンチ(分析の結果、ホルモン濃度は0.48ppm)を与えた。

対照区の2水槽にはホルモン無添加の魚肉ミンチを与えた。ホルモン投与終了後の日令125日からはホルモン区、対照区とも魚肉ミンチを与えて飼育した。サンプリングは、1試料5尾以上とし、原則としてサンプリング当日の朝の給餌前に行い、 $-20^\circ\text{C}$ で保存した。分析は食品衛生検査指針<sup>8)</sup>および宮崎ら<sup>9)</sup>の方法を組み合わせた図1に示す方法で、財団法人日本冷凍食品検査協会が行った。本法による $E_2$ の検出限界は0.005ppm、添加回収率は73.6%であった。

$E_2$ の残留結果を表1に示した。ホルモン区のホルモン投与期間中の試料からは、42日目の試料を除き0.005~0.011ppmの $E_2$ の残留が認められた。しかし、投与終了後1日目以降は検出されなかった。また、ホルモン投与前の試料と対照区からも $E_2$ は検出されなかった。

$E_2$ は生体内で急速に分解されるものと考えられている<sup>10)</sup>。山口外海水試<sup>7)</sup>は、 $E_2$ 0.3ppmを含む配合餌料をヒラメ稚魚の日令30日から70日までの41日間投与した場合、 $E_2$ 投与終了後3日目には既に検出限界以下になったと報告している。今回は、既報より投与 $E_2$ 濃度は高く、投与期間も長期であったが、投与終了の翌日には既に $E_2$ は検出されなかった。このことから、 $E_2$ は魚体内に入った後、1日以内という早い時間で分解されたものと考えられる。

試料 10.0 g  
 |  
 — アセトニトリル 25 ml, 2 回  
 抽 出  
 遠心分離 (約3,000回転/分, 10分間)  
 |  
 アセトニトリル層  
 |  
 — 3%塩化ナトリウム溶液 50 ml  
 — ジクロロメタン 40 ml, 10 ml  
 抽 出  
 水で洗浄  
 |  
 濃縮乾固 (45℃以下)  
 |  
 ボンドエルト, シリカゲルカラム (ベンゼンで負荷)  
 |  
 ベンゼン 5 mlで洗浄  
 |  
 酢酸エチル:エタノール (3:1) 5 mlで溶出  
 |  
 濃縮乾固 (45℃以下)  
 |  
 ヘキサン 10 mlに溶解  
 |  
 — 90%メタノール溶液 10 ml, 2 回  
 抽 出  
 |  
 メタノール層  
 |  
 濃縮乾固 (45℃以下)  
 |  
 ボンドエルト, ジエチルアミノプロピル (DEA) カラム  
 (5%酢酸エチル・ジクロロメタン溶液で負荷)  
 |  
 5%酢酸エチル・ジクロロメタン溶液 8 mlで洗浄  
 |  
 酢酸エチル:エタノール (3:1) 5 mlで溶出  
 |  
 濃縮乾固 (45℃以下)  
 |  
 ECD-HPLC  
 カラム: YMC Pack A-302 ODS (15cm×4.6mm I. D.)  
 検出器: 電気化学検出器  
 (1) ECD 1st 0.4 V  
 2nd 0.7 V  
 (2) Guard Cell 0.75 V  
 カラム温度: 35℃  
 移動相: 0.2%炭酸アンモニウム:アセトニトリル (70:45)  
 流速: 0.8 ml/min.  
 注入量: 30 μl

図1 エストラジオール-17βの分析方法

表1 エストラジオール-17βの残留

サンプリング日	実験区	分析部位	エストラジオール-17β 残留濃度(ppm)	日令 (日)	平均全長 (mm)	平均体重 (g)
投与前日		全魚体	N.D. <sup>*1</sup>	64	37.7	0.5
投与2日目	ホルモン区	全魚体	0.008	66	40.8	0.8
投与20日目	ホルモン区	全魚体	0.011	84	71.9	3.6
投与31日目	ホルモン区	全魚体	0.005	95	93.6	7.5
投与42日目	ホルモン区	全魚体	N.D. <sup>*1</sup>	106	110.0	12.5
投与42日目	ホルモン区	内臓 <sup>*2</sup>	N.D. <sup>*1</sup>	106	121.6	15.9
投与42日目	対照区	全魚体	N.D. <sup>*1</sup>	106	118.4	16.8
投与42日目	対照区	内臓 <sup>*2</sup>	N.D. <sup>*1</sup>	106	113.5	14.9
投与60日目	ホルモン区	全魚体	0.005	124	147.0	31.1
投与終了1日目	ホルモン区	全魚体	N.D. <sup>*1</sup>	125	150.2	35.0
投与終了1日目	ホルモン区	内臓 <sup>*2</sup>	N.D. <sup>*1</sup>	125	147.2	29.0
投与終了2日目	ホルモン区	全魚体	N.D. <sup>*1</sup>	126	148.8	31.3
投与終了5日目	ホルモン区	全魚体	N.D. <sup>*1</sup>	129	157.8	40.5
投与終了10日目	ホルモン区	全魚体	N.D. <sup>*1</sup>	134	166.3	45.0

\*1 : N.D., 検出されず (検出限界0.005ppm)

\*2 : 心臓, 腎臓を除く内臓, 消化管内容物を除く。

## 文 献

- 1) 原田輝雄・村田 修・宮下 盛・小田誠二・清水清和 (1983) : 養殖ヒラメの雌雄による成長度の相違について. 昭和58年度日本水産学会春季大会講演要旨集, 125.
- 2) 中本幸一・小野山 弘 (1985) : 飼育ヒラメにおける雌雄の成長差について. 兵庫水試研報, 23, 57-61.
- 3) 田中秀樹 (1988) : ヒラメの生殖腺の性分化に及ぼすエストラジオール-17βの影響. 養殖研報, 13, 17-23.
- 4) 大野和憲 (1989) : 性ホルモン処理によるヒラメの性分化誘導および餌料の違いによる性比の変動. 千葉水試研報, 47, 45-48.
- 5) 山田嘉孝・大野和憲・金子信一・玉井雅史 (1991) : ヒラメ雌性誘導のための雌性ホルモン投与条件について. 千葉水試研報, 49, 33-37.
- 6) 田畑和男 (1991) : ヒラメの染色体操作に関する研究. 兵庫水試研報, 28, 1-134.
- 7) 山口県外海水産試験場 (1991) : ヒラメの不稔化及び雌性化種苗の量産技術に関する研究. 平成2年度地域バイオテクノロジー研究開発促進事業報告書, 1-18.
- 8) 宮崎奉之 (1991) : ホルモン剤. 食品衛生検査指針 理化学編 第6章動物用医薬品・飼料添加物, 社団法人日本食品衛生協会, 東京, 452-459.
- 9) 宮崎奉之・橋本常生・丸山 務・松本昌雄・中澤裕之 (1989) : 高速液体クロマトグラフィーによる牛肉中のタンパク同化ホルモンの定量. 食衛誌, 30(5), 384-389.
- 10) (財)日本公定書協会 (1979) : C 第1部医薬品各条. 第9改正日本薬局方解説書, 広川書店, 東京, 223-229.