

平成10年度地域先端技術共同研究開発促進事業報告書

オニオコゼ全雌3倍体作出に関する研究

平成11年3月

石川県水産総合センター

目 次

1. 研究の背景及び目的	2
2. 研究計画	2
3. 研究方法	3
4. 結果及び考察	6
(1) 圧力処理による第1卵割阻止条件	6
(2) 圧力処理型第1卵割阻止法以外による4倍体誘起方法	8
(3) 4倍体の作出	10
(4) ホルモン処理による偽雄化の条件	10
(5) ホルモン注射による催熟	11
(6) 精液保存方法	14
5. 文 献	14

<担当機関及び担当者>

石川県水産総合センター

所	長	高橋 稔彦
技術開発部	部 長	山田 悦正
研 究 主 幹		高門光太郎
水産研究専門員		沢矢 隆之
技 師		戒田 典久 *
技 師		田中 正隆

*：試験及び執筆担当

オニオコゼ全雌3倍体作出に関する研究

石川県水産総合センター

1. 研究の背景及び目的

近年の海面魚類養殖は、ブリ、マダイ及びヒラメ等を対象として盛んに行われている。しかし、ブリ、マダイでは生産魚価の低迷、またヒラメではウイルス性疾病等による生残率の低下により、これら魚種の生産は頭打ちになりつつある。こういう状況の下で新たな養殖対象魚種の開発が強く望まれており、その一魚種としてオニオコゼも期待されている。本県では1990年から1994年にオニオコゼの陸上及び海面養殖の試験を実施し、養殖の可能性及びその方法について検討した。その結果、オニオコゼの雌は雄よりも成長は早いですが、雌は成熟すると高水温期に死に易い傾向にあることが明らかになった。本研究では、染色体操作技術を用いた4倍体及び全雌3倍体の作出によって、オニオコゼ養殖の生産性を向上させることを目的として試験を実施した。

2. 研究計画

研究項目	H 9	H10	H11	H12	H13	H14
第1卵割阻止条件						
4倍体作出に関する 他の技術						
4倍体の作出						
4倍体の飼育特性、 生態特性						
ホルモン処理による偽雄化 の条件と作出						
ホルモン注射による催熟 精液保存方法						
4倍体を用いた全雌3倍体の 作出						
全雌3倍体の飼育特性、 生態特性						

3. 研究方法

(1) 圧力処理による第1卵割阻止条件

卵割阻止法によって4倍体を作成するには、圧力処理開始時間、処理圧力及び加圧時間等の適正条件の究明が重要である。そこで、卵割阻止型雌性発生2倍体を誘起し、その誘起率から適正条件を検討した。

供試卵は冷凍アジ等で養成している天然オニオコゼ親魚、あるいは当センターで孵化させ配合飼料、モイストペレットで養成したオニオコゼ親魚より採卵した。卵は実験区ごとに50mlガラス製サンプル瓶へ分注した。そしてこの中へ人工卵漿を添加し、処理開始まで10℃で保持した。この卵に実験区へは紫外線照射イシダイ精子、対照区へは通常オニオコゼ精子を媒精した。これらの精液は顕微鏡でその挙動が優れているものを選び使用した。なお媒精時及び洗卵には水温23℃(±0.2℃)の海水を用いた。さらに処理開始まではウォーターバスによって水温23℃(±0.2℃)で保持した。

実験は下に記した内容で3回ずつ行った。

(ア) 処理圧力の検討

媒精4分30秒後に圧力を10～100MPaの間で10MPaずつ増加させ6分間加圧処理し、第2極体の放出を阻止した。これにより適正処理圧力の基礎的知見を得ることにした。

(イ) 圧力処理開始時間の検討

媒精20～50分後の間で2分間隔ずつ及び25分後に圧力30MPaで5分間の加圧処理をし、適正な処理開始時間を検討した。

(ウ) 圧力処理時間の検討

媒精22、24分後に圧力30MPaで1、5、7、10、15分間の加圧処理をし、適正圧力処理時間を検討した。

(2) 圧力処理型第1卵割阻止法以外による4倍体誘起方法

魚類の4倍体を誘起する方法として、圧力処理によって第1卵割を阻止する方法が知られている。しかし、その誘起率は高いとは言えない。そこで、他の方法として、卵割阻止における電気刺激の有効性について検討した。

今年度は基礎的知見を得るために第2極体放出阻止を試みた。実験時のパルス強度及びパルスパターンの性質は、低周波発生装置の表示目盛りで検討した。

供試卵は当センターで孵化させ配合飼料、モイストペレットで養成したオニオコゼ親魚より採卵した。卵は実験区ごとに50mlガラス製サンプル瓶へ分注した。そしてこの中へ人工卵漿を添加し、処理開始まで10℃で保持した。この卵に実験区へ紫外線照射イシダイ精子、対照区へ通常オニオコゼ精子を媒精した。これらの精液は顕微鏡でその挙動が優れているもの

を選び使用した。なお媒精時及び洗卵には水温23℃（±0.2℃）の海水を用いた。さらに処理開始まではウォーターバスによって水温23℃（±0.2℃）で保持した。処理は浸透圧360mOsm/kgに調製したグルコース溶液中で行った。実験1は媒精4分30秒後にパルスパターン1あるいはパルスパターン2で強度1～5の電気刺激を印加し、実験2は強度2と4のみを印加した。

(3) 4倍体の作出

全雌3倍体は、4倍体雌と偽雄2倍体を交配することにより大量に効率よく作出できると考えられる。そこで現在までに得た誘起条件で4倍体の作出を試みた。

供試卵は冷凍アジ等で養成している天然オニオコゼ親魚より採卵した。その後これに水温23℃（±0.2℃）の海水を添加してから通常オニオコゼ精子を媒精した。これらの精液は顕微鏡でその挙動が優れているものを選び使用した。なお媒精時及び洗卵には水温23℃（±0.2℃）の海水を用いた。さらに処理開始まではウォーターバスによって水温23℃（±0.2℃）で保持した。

処理は媒精23分後に30MPaで5分間の加圧を行った。

(4) ホルモン処理による偽雄化の条件

全雌3倍体大量作出には、偽雄の作出が必要である。その方法としてホルモン処理により雌を偽雄化する技術が知られている。しかし、魚種によって処理に必要な期間やその濃度は異なっており、これらを正確に把握することが重要である。そこで今年度は性統御するための必要な基礎的知見を得るために、種苗生産したオニオコゼの生殖腺の発達と性分化の過程を組織学的に観察した。

供試魚は冷凍アジ等で養成している天然オニオコゼ親魚より自然産卵により採卵した。

採卵量は胚体形成卵で56,000粒、その内10,000粒を500l容水槽に収容した。孵化率は89.5%で、孵化後2日目から栄養強化したシオミズツボウムシと配合飼料、更に孵化後6日目から栄養強化したアルテミアを加えて、それぞれを成長に合わせて適宜給餌した。飼育水の水温は、孵化後144日目までは自然海水温とし15.8～27.6℃、それ以後、低水温期には加温し20.8～23.1℃であった。

表1 性分化過程観察の供試魚

日齢	平均全長 mm (範囲)	平均体重 g (範囲)	サンプル数
15	8.4 (6.2-10.1)	—	10
30	12.7 (10.8-15.1)	—	10
45	15.2 (12.6-21.1)	—	10
60	19.6 (15.4-26.7)	—	10
75	22.0 (17.1-27.5)	—	10
90	26.8 (17.5-36.4)	—	10
105	27.9 (19.3-34.7)	—	5
120	40 (30-52)	1.6 (0.6-3.4)	5
135	39 (28-49)	1.4 (0.5-2.5)	5
150	43 (39-46)	1.8 (1.3-2.2)	5
165	50 (42-56)	2.6 (1.5-3.6)	5
180	57 (50-63)	3.9 (2.6-5.3)	5
195	65 (55-73)	5.8 (3.5-8.1)	5
210	73 (66-80)	7.8 (6.0-9.9)	5

サンプルは孵化後15日目から15日間隔で5ないし10尾ずつ無作為抽出し（表1）、麻酔をしてから全長及び体重を測定した。そして全長30mm以下ではそのまま或いは頭部及び尾鰭を切除し腹部を切開して、それ以上では生殖腺とその周辺の組織のみをブアン液で固定した。組織標本の作製は、サンプルをパラフィンに包埋し、7 μ mの連続横断面組織切片標本を作製し、マイヤーのヘマトキシリンとエオシンの二重染色を施して光学顕微鏡で観察した。

(5) ホルモン注射による催熟

本事業における卵を供試した実験は、自然に成熟した卵を用いている。この場合、いつ成熟した良卵が取れ、実験できるか計画をたてることが困難である。そこでホルモン注射により人工的に催熟し、良卵を得るための条件を検討した。

供試魚は当センターで孵化させ配合飼料、モイストペレットで養成したオニオコゼを各区3尾ずつ用いた。排卵誘発に胎盤性性腺刺激ホルモン（ゴナトロピン5000：帝国臓器製）及びシロサケ脳下垂体（マルハ製）を用い、各実験区の全量が0.5ml/kg·BWとなるようにBSSへ溶解及び懸濁し、体側筋へ注射した。

実験期間中は無給餌とし、飼育水温を23℃に一定させた。

成熟度の判定は経過日数ごとに重量測定を行い、注射前の重量に対する増重率及び腹部膨満状況による成熟評価によって判断した。すなわち、それらは以下の方法で算出あるいは評価した。

$$\text{増重率 (\%)} = (\text{t 日後の重量 g} - \text{開始時の重量 g}) \times 100 / \text{開始時の重量 g}$$

成熟評価

- 0：腹部の膨満が全く見られない
- 1：少し腹部が膨満しているが堅い
- 2：少し腹部が膨満していて柔らかい
- 3：大きく腹部が膨満していて柔らかい

(ア) 胎盤性性腺刺激ホルモン

ホルモン注射区は1～4区で、それぞれ100、500、1,000、2,000IU/kg·BWとなるようにBSSへ溶解した。対照区はBSSのみを注射した。さらに1区-1、対照区-1の6日目に800IU/kg·BWを注射した。

(イ) シロサケ脳下垂体

脳下垂体懸濁液注射区は1～4区で、それぞれ0.5、1.0、2.0、4.0mg/kg·BWとなるように脳下垂体をBSS中でホモジナイズし懸濁させた。対照区はBSSのみを注射した。

(6) 精液保存方法

オニオコゼの雄から採取できる精液は僅かで、採取された精液を凍結等によって保存し、有効に利用して試験の効率化をはかる。

今年度は、精液凍結保存法から少し離れ、オニオコゼ精子を卵に媒精したときの受精率の変動について考察した。

配合飼料で養成したオニオコゼ雄親魚数尾を開腹し、精巢、輸精管及び膀胱を採取した。それぞれから精液あるいは尿を別々に採取し、尿はそのまま、精液からは遠心分離によって精漿を得た。これらを超純水で20倍に希釈した後に限外濾過膜で除蛋白をした。更に陰イオンの分析には超純水で10倍に希釈して供した。分析に用いたカラム及び移動相は、陽イオン分析ではShim-pack IC-C3のカラムで移動相に2.5mM/l シュウ酸を用い、陰イオン分析にはShim-pack IC-A3のカラムで移動相に8.0mM/l p-ヒドロキシ安息香酸、3.2mM/l Bis-Trisを用いた。イオンクロマトグラフにはLC-10Aイオンクロマトグラフ分析システム (LC-10AD、CDD-6A、CTO-10A；島津製作所製) を使用した。

4. 結果及び考察

(1) 圧力処理による第1卵割阻止条件

(ア) 処理圧力の検討

実験結果を図-1に示した。胚体形成率は処理圧力が増すにつれ高くなり30、40MPaで30.3~53.4%になった。その後、圧力が増すと次第に低くなった。半数体区 (n) の胚体形成率は49.8~66.7%であったのに対し、2倍体区 (2n) は0%あるいは55.2%と顕著な差が見られた。

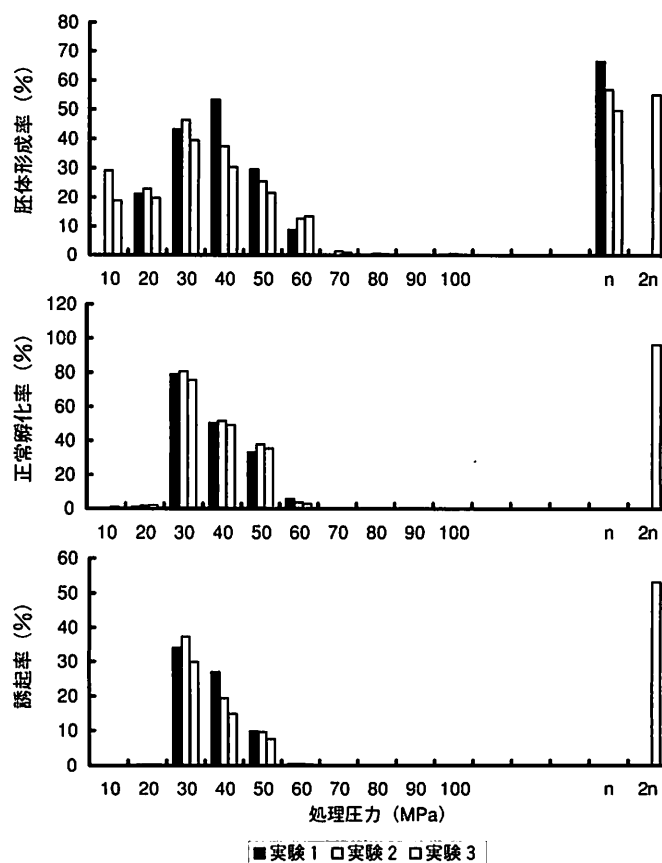


図1 第2極体放出阻止における処理圧力と胚体形成率、正常孵化率及び誘起率

正常孵化率は処理圧力10、20MPaで2.1%以下と低かったが、30MPaで回復し75.6～80.6%になった。その後、圧力が増すと低くなり70MPa以上では正常孵化仔魚は全く得られなかった。またn区にも正常に孵化する仔魚はいなかった。2n区は胚体形成率と同様に顕著な差が見られ、0%あるいは53.2%であった。

以上のことから処理区の誘起率は処理圧力10、20MPaで低く、30MPaで回復し29.9～37.4%と最も高くなった。その後、圧力が増すと次第に低くなり70MPa以上では0%であった。

他の魚種における適正圧力はサケ、サクラマス、ヒラメで63.7MPa、ニジマス50～63.7MPa、イワナ70MPa、ゼブラダニオ55MPaである。これらよりもさらに低い圧力で誘起できるウグイで40MPaである。オニオコゼはこれよりもさらに低い圧力で誘起された。この要因は今のところ分からないが、オニオコゼの卵は他の魚種より弱い可能性も考えられる。

(イ) 圧力処理開始時間の検討

実験結果を図-2に示した。胚体形成率は媒精20分後から24分後まで次第に高くなり、媒精24分後で31.2～37.1%であった。その後、時間が長くなるにつれ低くなった。また本実験においても、2n区の頻度に顕著な差が見られた。

正常孵化率は2n区および媒精34分後の2回目の実験以外で低かった。媒精22～24分後で0～4.0%で、その後28分後まで0～1.0%と低かったが30分後から回復し0～66.7%になった。その後は正常孵化仔魚は得られなかった。

処理区の誘起率は媒精22、24分後で高く0～1.47%であった。

媒精34分後の2回目の実験で正常孵化率が非常に高かったのは、胚体形成卵が3個で、その内2個が正常に孵化したためであった。

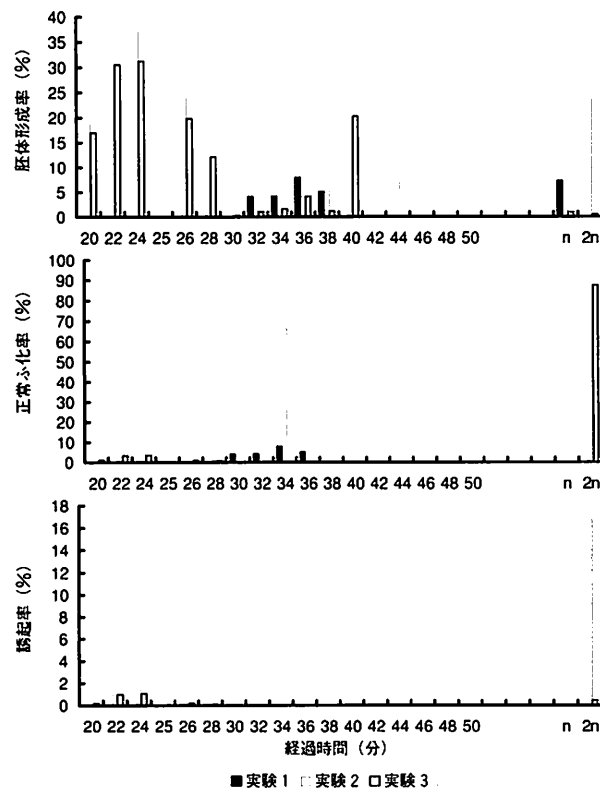


図2 第1卵割阻止における圧力処理開始時間と胚体形成率、正常孵化率及び誘起率

(ウ) 圧力処理時間の検討

実験結果を図-3に示した。媒精22分後に処理をした時の胚体形成率は各区で顕著な違いは見られず3.0~9.3%であった。媒精24分後に1分間処理した区の胚体形成率は0~8.5%、5分間処理区は0.4~15.6%であった。さらに処理時間が長くなると次第に低くなり、7分間処理区で2.3~5.5%、10、15分間処理区で1.8%以下であった。2n区は0~1.0%と低かったが、n区は5.2~23.5%であったため、卵質に問題があったのではなく、オニオコゼの精子に問題があった可能性が考えられる。

正常孵化率は媒精22分後5、7、10分間処理区で高く、それぞれ1.7~2.3%、1.3~2.7%、1.5~1.8%であった。媒精24分後処理では10、15分間処理区で多くの孵化仔魚が得られた。

処理区で誘起率が高かったのは媒精22分後5、7、10分間処理区で、それぞれ0.11~0.19%、0.08~0.22%、0.13~0.16%であった。媒精24分後処理の1分間処理区で0~0.06%であったが、5分間処理区は全く誘起されなかった。さらに処理時間が長くなると回復する傾向が見られた。このことから、処理時間を長くして得られた正常孵化仔魚は、第1卵割阻止でなく第2卵割阻止の可能性も考えられる。

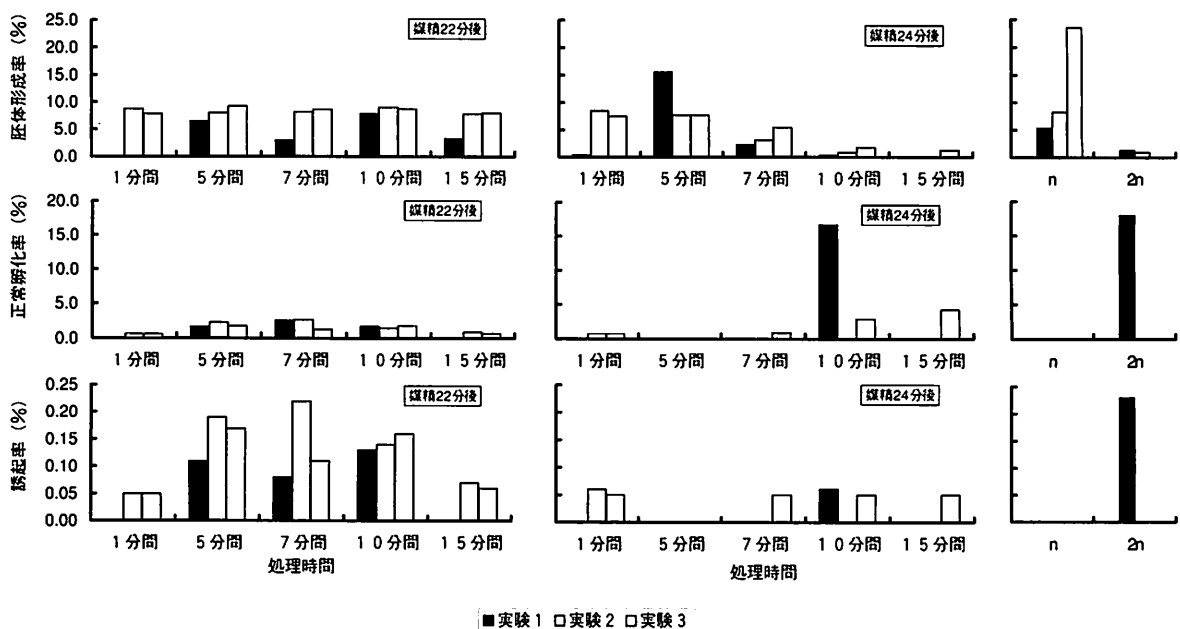


図3 第1卵割阻止における圧力処理開始時間と胚体形成率、正常孵化率及び誘起率

(2) 圧力処理型第1卵割阻止法以外による4倍体誘起方法

図-4、5、6にそれぞれ胚体形成率、正常孵化率そして誘起率の結果を示した。

今回の実験に用いた処理容器は、即席で自作のため不備な点が多々あった。また処理方法についても改善すべき点が見られた。そのため本実験では、実験区間でデータの比較をするのは適切でない。しかし、正常孵化仔魚を得られたことから卵割阻止にも有効である可能性が示唆された。

今後さらに処理容器及び処理方法を改善し実験を行いたい。

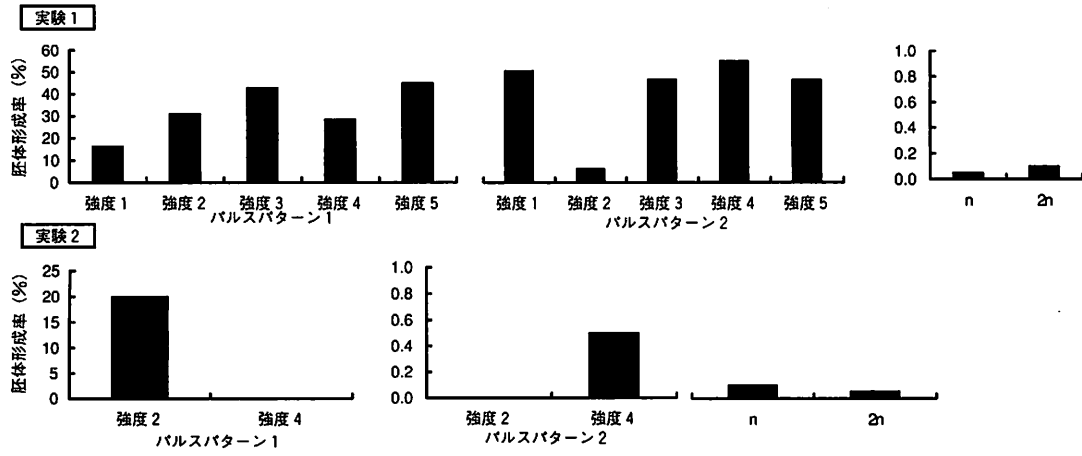


図4 第2極体放出阻止における電気刺激強度と胚体形成率

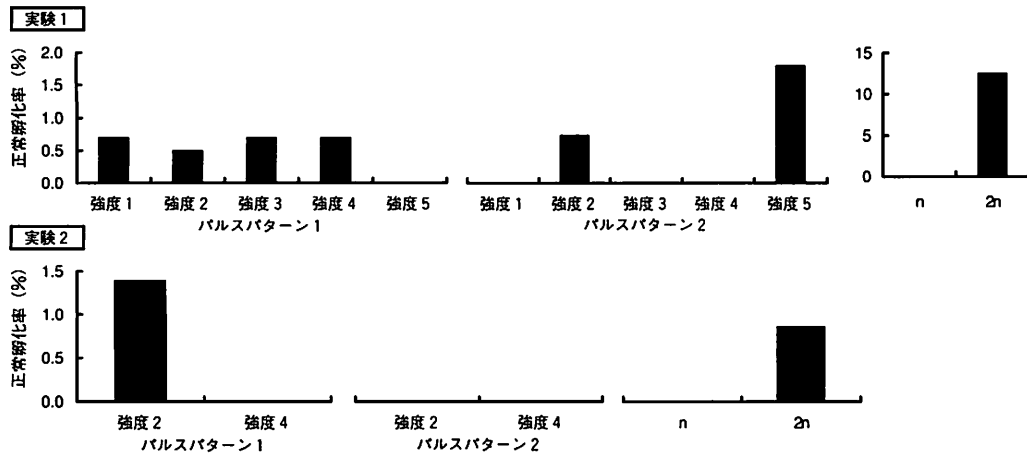


図5 第2極体放出阻止における電気刺激強度と正常孵化率

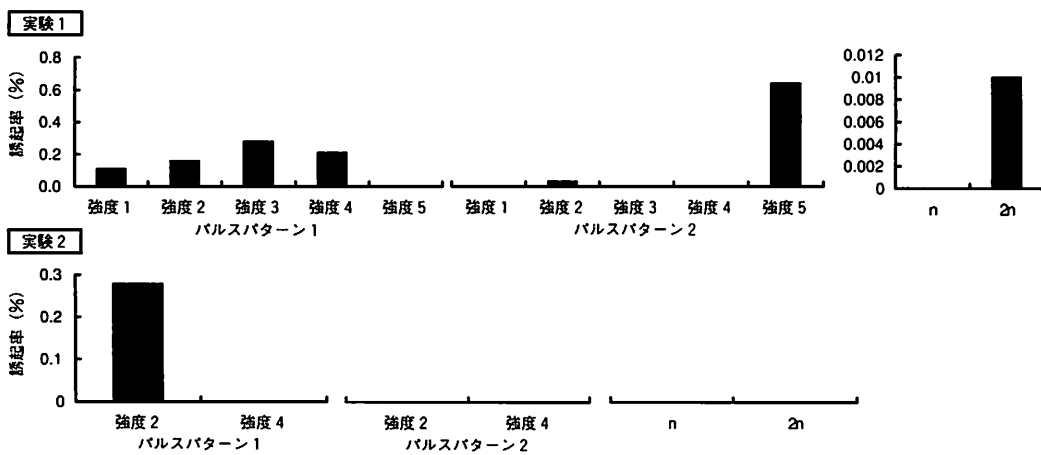


図6 第2極体放出阻止における電気刺激強度と誘起率

(3) 4倍体の作出

誘起結果を図-7に示した。胚体形成率は60.1%、正常孵化率は68.3%となり、誘起率は41.0%で、正常孵化仔魚を16,000尾得た。これらのうち、生残した315尾について尾鰭上皮細胞を銀染色し、4倍体化の確認を行った。その結果、4倍体化されている個体は全くいなかった。

雌の4倍体が1尾でも存在していたら、4倍体の大量作出が容易となる。すなわち、これを親魚まで養成し、採卵後に雌性発生2倍体化処理を施すと、それによって誘起された孵化仔魚は全て4倍体となる。

4倍体の作出の成功は、次年度に期待したい。

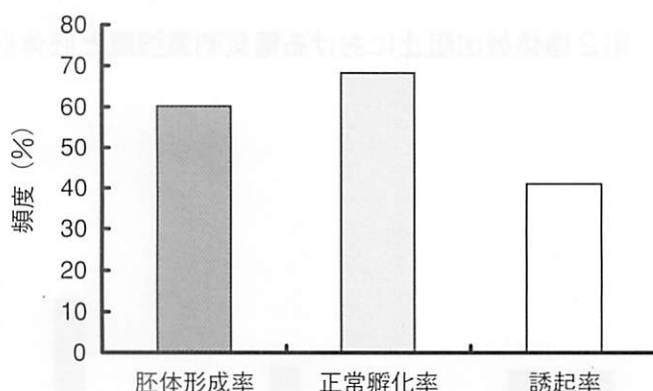


図7 4倍体の誘起結果

(4) ホルモン処理による偽雄化の条件

全長8.4mm（孵化後15日目）の仔魚に体細胞と1～4個の生殖細胞からなる生殖腺隆起が中腎輸管と消化管の間の体腔背壁に観察された。生殖隆起は体細胞要素に富んでおり、始原生殖細胞を取り囲んでいた。始原生殖細胞の直径は10～15 μm で核のそれは5～10 μm の円形をしていた。

全長12.7mm（孵化後30日目）の仔魚は体色が褐色化し着底する個体も出現し、仔魚期から稚魚期へ移行し始める時期である。生殖腺は生殖細胞の増殖に伴い少し大きくなるが、顕著な変化は観察されず、まだ性的に未分化な状態であった。

全長15.2mm（孵化後45日目）に一部の生殖腺の前方部で、先端部の体細胞が増殖し伸長するのが観察された。

全長19.6mm（孵化後60日目）の生殖腺には内腔が見られる個体と見られない個体が出現し、組織形態に違いが観察された。この内腔は将来卵巣腔に発達するものと思われた。生殖腔は生殖腺前方部で見られ、後方部では体細胞の伸長による腔の形成が始まっていた。しかし、中央部では腔の形成は未だ見られなかった。生殖腺は体腔背壁に垂下した状態で、背側に生殖細胞が多数有り包囊を形成し始めていた。腹側は体細胞の薄層に生殖細胞が点在していた。

全長26.8mm（孵化後90日目）、全長27.9mm（孵化後105日目）には卵巣で卵巣腔及び生殖細胞による包囊の形成が盛んに行われた。

全長40mm（孵化後120日目）には生殖腔が形成されていない生殖腺でも包囊が観察されるようになった。

全長57mm（孵化後180日目）には一部の卵巢の卵巢腔で小葉構造の形成と思われる変化が見られた。

全長73mm（孵化後210日目）までの生殖細胞は休止期であったが、全長79mm（孵化後225日目）になると卵巢で減数分裂を始める生殖細胞が観察され始めた。

全長85mm（孵化後240日目）ではさらに卵巢で減数分裂をする生殖細胞の数が増大した。

これら一連の観察から、オニオコゼはマダイ、クロダイ等と同じ雌雄同体現象は観察されず、ヒラメやトラフグに類似した発達段階を示した。しかし、卵巢腔が比較的早い段階で形成されるのに対し、生殖細胞の減数分裂はかなり遅かった。例えば、ヒラメの卵巢で孵化後80日目以降に、精巣で孵化後120日目以降に、またトラフグの卵巢では孵化後75日目以降に分裂が始まる。オニオコゼの場合は卵巢で孵化後210日目から観察され、精巣では孵化後240日目でも観察されなかった。加えて今回は低水温期に加温飼育していたので、自然水温下では更に減数分裂の開始は遅くなる。そこで卵巢で減数分裂が観察された時の全長と自然水温下で飼育した時の全長を比較し、自然水温下飼育での日齢に換算すると孵化後380日目付近になる。

この様にオニオコゼの生殖腺の発達は、特異的な様子を示すが低水温期に20℃位の加温飼育をした場合、孵化後105日目にはすでに性分化をしている。従って、性統御をする時には孵化後105日目までを目安とすると良いと思われる。

(5) ホルモン注射による催熟

(ア) 胎盤性性腺刺激ホルモン

図-8、9にそれぞれ増重率変化、成熟評価の推移を示した。注射6日後までのホルモン濃度 500 IU/kg・BW以下では1尾を除いて顕著な変化はなかった。変化の見られた2区-3は注射1日後に7.18%増重し、2日後に採卵できた。採卵量は約13,500粒であったが、浮上卵はそのうちのたった120粒でしかなかった。実験開始6日後にホルモン濃度800IU/kg・BW注射した1区-1は、その2日後から増重し始め10.88%になった。しかし、その後次第に減じた。3区は注射の翌日から全個体とも増重し始め2日後に採卵できた。3区-2は腹部を膨満したままへい死しており、腹部を圧迫すると約88,100粒採卵できたが全て沈下卵であった。3区-1から約36,100粒、3区-3からは約7,400粒採卵できたが、浮上卵はそれぞれ60粒そして2粒しかなかった。4区-1は2日後に採卵できたが、これも卵質は悪く、採卵量約21,600粒のうち浮上卵は15粒であった。対照区-2はわずかに増重したが、3日後に原因不明のへい死をした。

対照区-1の6日後にホルモン濃度 800 IU/kg・BWを注射したところ、翌日から18.56%増重した。そして3日後に全体が軽く白濁した卵あるいは中心部に白濁核を持つ卵が採取できた。

成熟評価では2区-3、3区-2、4区-1、2、3、ホルモン注射以降の対照区-1の様に、注射後評価が上がるものと、その他の様に下がるものとがあった。これは注射した時の卵の成熟状態によって変わると考えられる。評価3の個体は数日後に評価が下がることから卵成熟がかなり進んでいると考えられ、ホルモンを注射しても良卵は得られないと思われる。よって評価1~2の間にある個体を選び注射する必要がある。

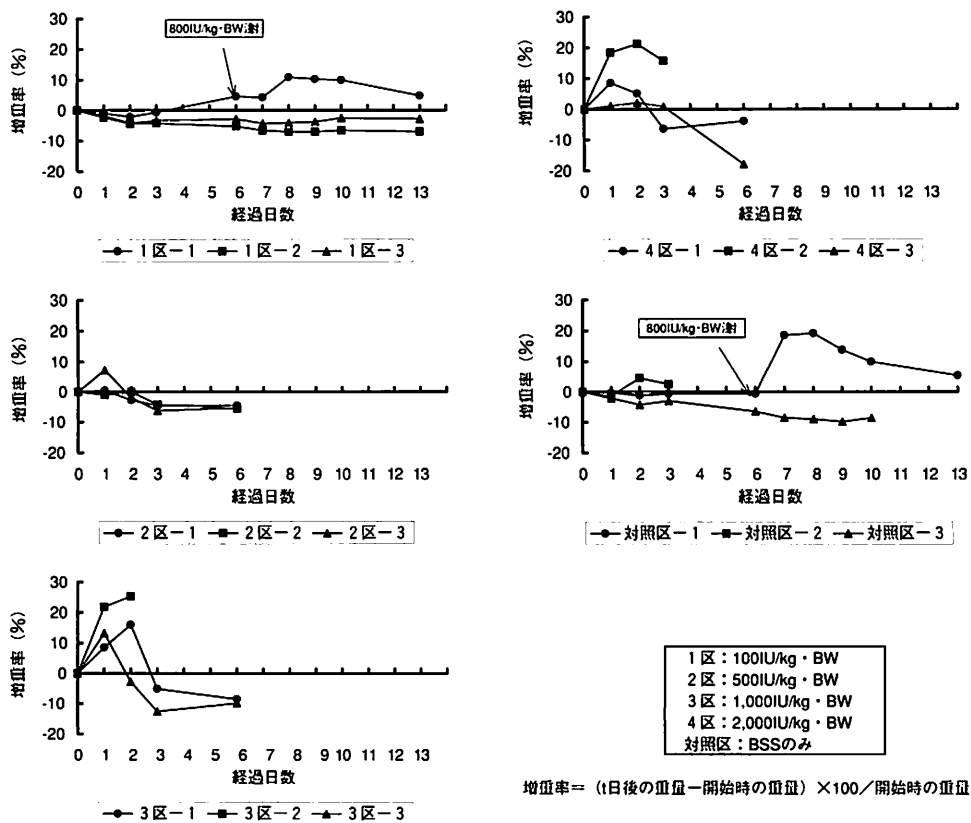


図8 胎盤性性腺刺激ホルモン注射濃度と増重率の変化

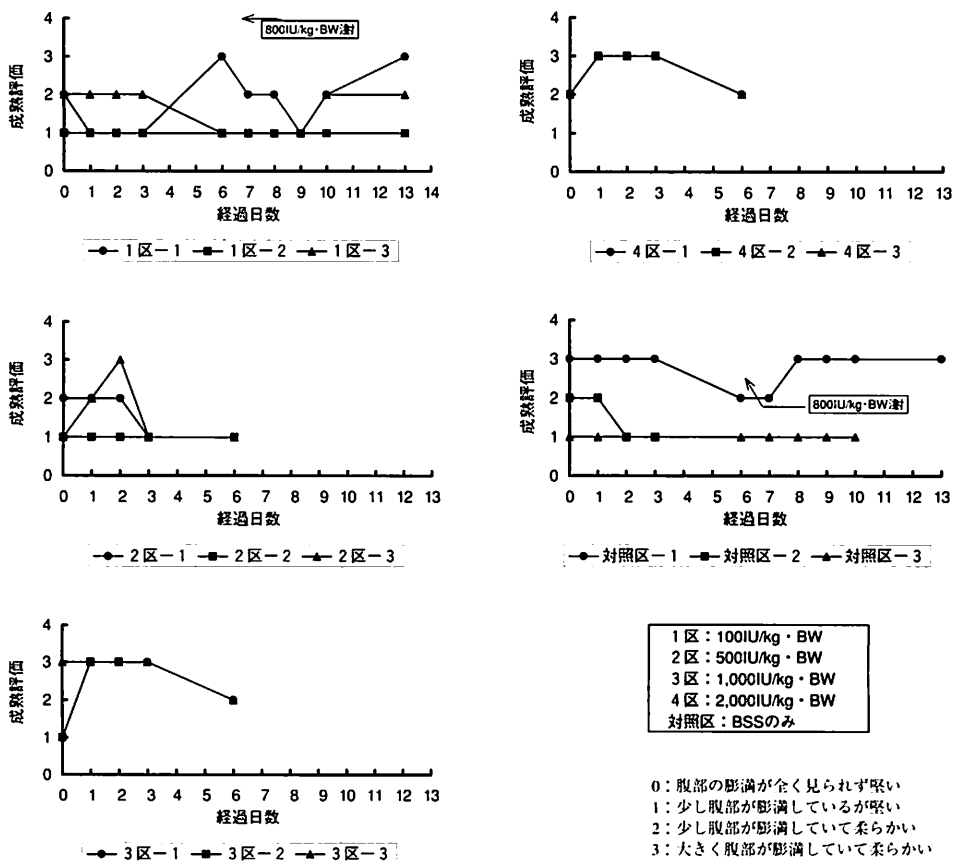


図9 胎盤性性腺刺激ホルモン注射濃度と成熟評価の推移

(イ) シロサケ脳下垂体

図-10、11にそれぞれ増重率変化、成熟評価の推移を示した。今回の実験ではいずれの区も全く増重せず、対照区より減じる傾向さえ見られた。成熟評価についても、その評価を維持あるいは下げた。

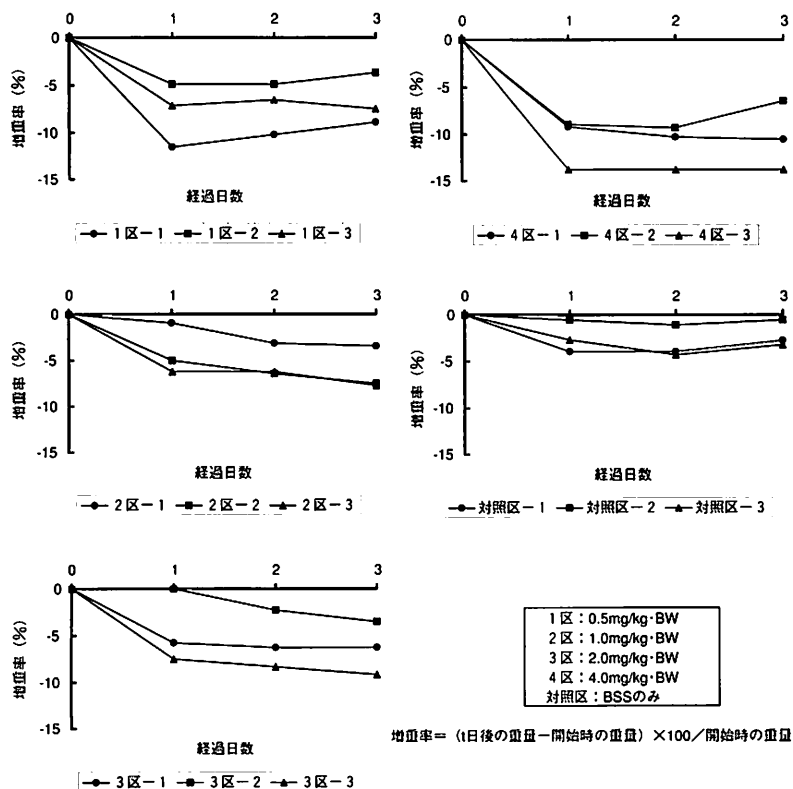


図10 シロサケ脳下垂体注射濃度と増重率の変化

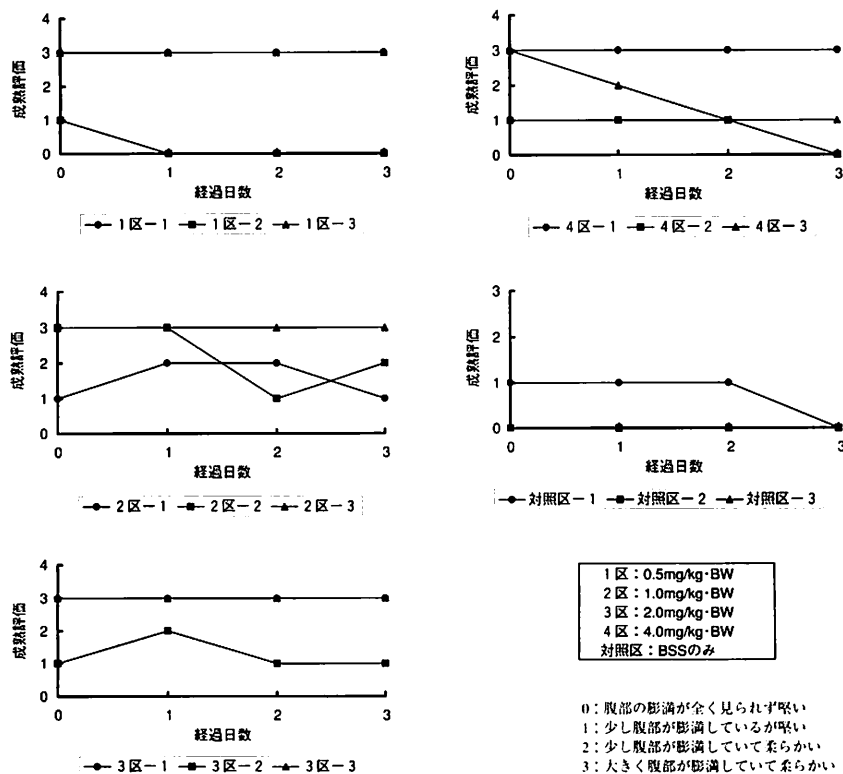


図11 シロサケ脳下垂体注射濃度と成熟評価の推移

(6) 精液保存方法

図-12から精漿と尿のイオン組成が非常に似ていることが分かる。Na⁺濃度は、精巣内精漿250.8mM/l、輸精管内精漿195.9mM/lに対し精漿及び尿は低く、それぞれ55.4mM/l、82.1mM/lであった。K⁺濃度は輸精管内精漿が最も高く59.7mM/l、次いで精巣内精漿11.6mM/l、精漿8.9mM/l、尿は非常に低く2.5mM/lであった。Ca²⁺濃度は精漿が高く20.5mM/l、精巣内精漿、輸精管内精漿そして尿はそれぞれ2.3mM/l、0.29mM/l、3.8mM/lであった。昨年度の精漿の分析によって、他魚種よりかなり高く問題が提起されたMg²⁺濃度は、精巣内精漿及び輸精管内精漿が14.8mM/l、8.8mM/lであったのに対し、精漿と尿は117.0mM/l、104.6mM/lとほぼ同じレベルの濃度であった。

精液は腹部圧迫により尿をできる限り排出させ、生殖孔を乾いたタオルで拭いてから、尿が混入しない様に細心の注意を払って採取している。しかし、受精率が低く、イオン組成が精巣内精漿や輸精管内精漿とは異なり尿と非常に類似していることから、尿が混入していた可能性が高い。

このことから、オニオコゼの人工授精方法は乾導法より、湿導法の方が高い受精率が得られると考えられる。

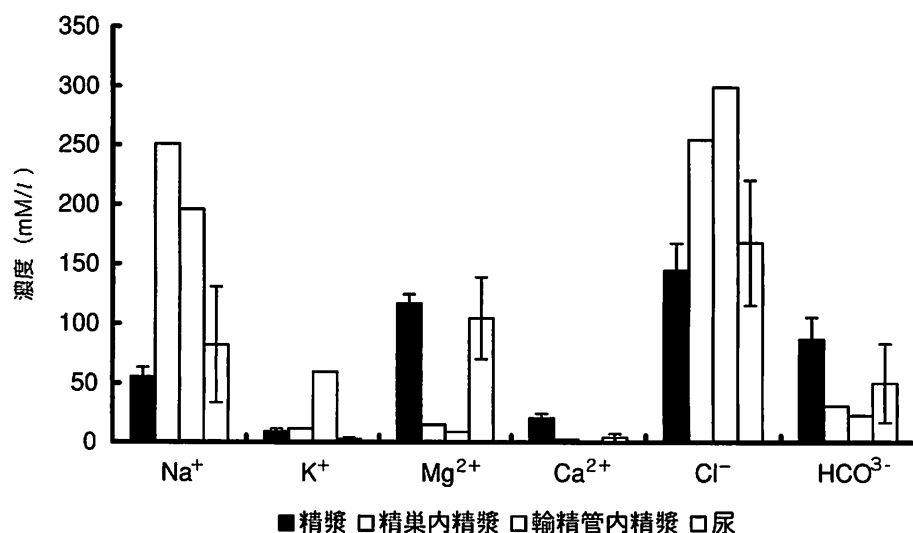


図12 イオン組成分析結果

5. 文献

- (1) F.Takashima, R.Patino, and M.Nomura: Histological Studies on the sex differentiation in Rainboe Trout., Bull.Japan.Soc.Sci.Fish., **46**, 1317-1322 (1980)
- (2) H.Yoshikawa and M.Oguri: Sex differentiation in a Cichlid, Tilapia zillii, Bull.Japan.Soc.Sci.Fish., **44**, 313-318 (1978)
- (3) 鈴木克美: 綜説 硬骨魚類の雌雄同体现象, 栽培技研, **18**, 45-55 (1989)
- (4) 松浦修平, 内藤剛, 新町充人, 吉村研治, 松山倫也: トラフグ生殖腺の性分化過程, 水産増殖, **42**, 619-625 (1994)
- (5) 鈴木伸洋, 田村正之, 大内一郎, 広松和親, 杉原拓郎: マコガレイ生殖腺の性分化過程, 水産増殖, **40**, 189-199 (1992)

- (6) 田中秀樹：ヒラメ生殖腺の性分化過程，養殖研報，11，7-19（1987）
- (7) 鈴木伸洋，岡田一宏，神谷直明：トラフグ生殖腺の性分化過程と性比，南西水研研報，29，39-48（1996）
- (8) 田畑和男：ヒラメの染色体操作に関する研究，兵庫水試研報，28，1-134（1991）
- (9) 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，34，1-145（1995）
- (10) 中園明信，桑村哲生 編：⑨動物 その適応戦略と社会，東海大学出版会，東京，1987
- (11) 及川紀久雄，鈴木義仁，砂原広志，田中一彦，二木安之，本間春雄，松下駿，武藤義一，村野健太郎：イオンクロマトグラフィー，共立出版，東京，1988
- (12) 板沢靖男，小栗幹郎，田村保，羽生功：新版魚類生理学概論（田村保編），恒星社厚生閣，東京，1991