

平成9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10年3月

石川県水産総合センター

目 次

I	研究の背景及び目的	2
II	研究計画	2
III	平成9年度の試験結果	
	1. 第1卵割開始時期の観察	3
	2. 圧力処理による第1卵割阻止条件	4
	3. 圧力処理型第1卵割阻止法以外による4倍体誘起方法	5
	4. 精液保存方法の検討	11
	(1) 精漿分析	11
	(2) 精液凍結保存試験	11
	5. ホルモン処理による偽雄化条件	14
IV	要 約	14
V	文 献	15

<担当機関及び担当者>

石川県水産総合センター

	所	長	中道	五郎
技術開発部	部	長	山田	悦正
	研 究 主 幹		町田	洋一
	水産研究専門員		沢矢	隆之
	技 師		戒田	典久 * 1
	技 師		田中	正隆

* 1 : 試験及び執筆担当

I 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、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。

II 研究計画

研究項目	H 9	H 10	H 11	H 12	H 13	H 14
第1 卵割阻止条件						
4倍体魚作出に関する 他の技術						
4倍体魚の作出						
4倍体魚の飼育特性、 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倍体魚の飼育特性、 生態特性						

Ⅲ 平成9年度の試験結果

1. 第1卵割開始時期の観察

圧力処理による4倍体作出方法は、第1卵割阻止時の処理開始時間が問題となる。サケ、マス類では精子の種類が異なると受精卵の発生速度に違いが見られるとされている。そこでオニオコゼ卵(O)に通常のオニオコゼ精子(O)、UV照射オニオコゼ精子(UVO)そしてUV照射インダイ精子(UVI)をそれぞれ別々に媒精し、卵の発生速度の相違について検討した。

方 法

配合飼料で養成した1尾のオニオコゼ雌親魚から得た卵を3等分し、それぞれの精液を加えた。そして水温23℃の海水を添加し受精させた。その後、直ちに洗卵をして水温が23℃となる様に調整したインキュベーターへ収容した。卵割の観察は、媒精後の卵を2分間隔で60分後まで2%パラホルムアルデヒド-2.5%グルタルアルデヒド固定液に4℃で固定し、胚盤の一部に少しでも卵割溝が観察される時点を卵割開始とした。

結果及び考察

図1は、媒精経過時間毎の検卵数に対する卵割開始卵数の割合である。いずれの精液でも媒精50分後から第1卵割が始まり54分後付近でその割合が最高となる。そして58分後までにすべての卵に卵割溝が形成され2細胞期に至る。従って、いずれの精液を用いても発生速度に違いは見られないことが明らかである。

卵割阻止に有効な時期は細胞分裂中期であることから、実際に卵割阻止をするには卵割溝を形成する細胞分裂終期よりも前に圧力処理を行う必要がある。従って圧力処理による4倍体作出の誘起率向上には、媒精から細胞分裂中期までの経過時間を正確に求める必要があり、更に個々の卵の卵割開始時間に相違が見られることから、細胞分裂中期までの経過時間が分散していると考えられる。従ってこれらの発生を同調させることも必要である。

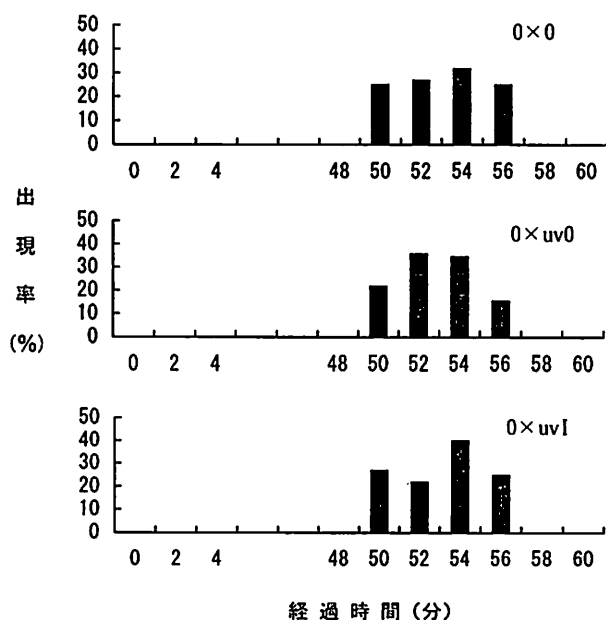


図1 媒精後の経過時間に伴う卵割溝の出現

2. 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、紫外線(UV)照射イシダイ精子(UVI)を用いた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。

方 法

供試卵は冷凍アジ等で養成している天然オニオコゼ雌親魚、あるいは当センターでふ化させ配合飼料で養成した養成オニオコゼ雌親魚より採卵した。この卵に試験区にはUV照射イシダイ精子、対照区に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。なお媒精時および洗卵には水温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。

試験区の設定は次の通りとした。

試験1：媒精1、5、10、20、30、40、50、60分後の処理開始、半数体区(n)そして対照区(2n)。

試験2：媒精10、12、14、15、18、20、22、24、26、28、30分後の処理開始、nそして2n。

試験3：30、40、50、60、70、80分後の処理開始、nそして2n。

これらの一連の試験の処理条件は、処理圧力650kgf/cm²(約640mPa)で5分間とした。最終的な判断の指標となる誘起率は、正常孵化仔魚数/供試卵数×100で示した。

結果及び考察

試験1の処理区の胚体形成率は媒精10分後で3.8%、60分後で3.5%であったが、60分後では正常孵化仔魚を得られなかった。唯一、10分後で正常孵化仔魚が得られ、その誘起率は0.97%であった。試験2でも媒精24分後で胚体形成率0.4%と最高であったが、18分後以外で正常孵化仔魚を得ることが出来なかった。媒精18分後に圧力処理をした時の誘起率は0.07%であった。試験3の媒精30分後、60分後のそれぞれの胚体形成率は0.3%、0.4%であったが、ここでも正常孵化仔魚が得られたのは、30分後の試験区のみであった。その時の誘起率は0.01%であった。これらの試験より媒精10～30分後の間に圧力処理をすると有効と思われた。一連の試験の誘起率が時間経過に伴い一定の傾向を示していないこと、半数体区及び対照区の胚体形成率も10.1%以下といずれも低いことから、採卵時の卵質や卵操作時の影響が大きかったと考えられる。

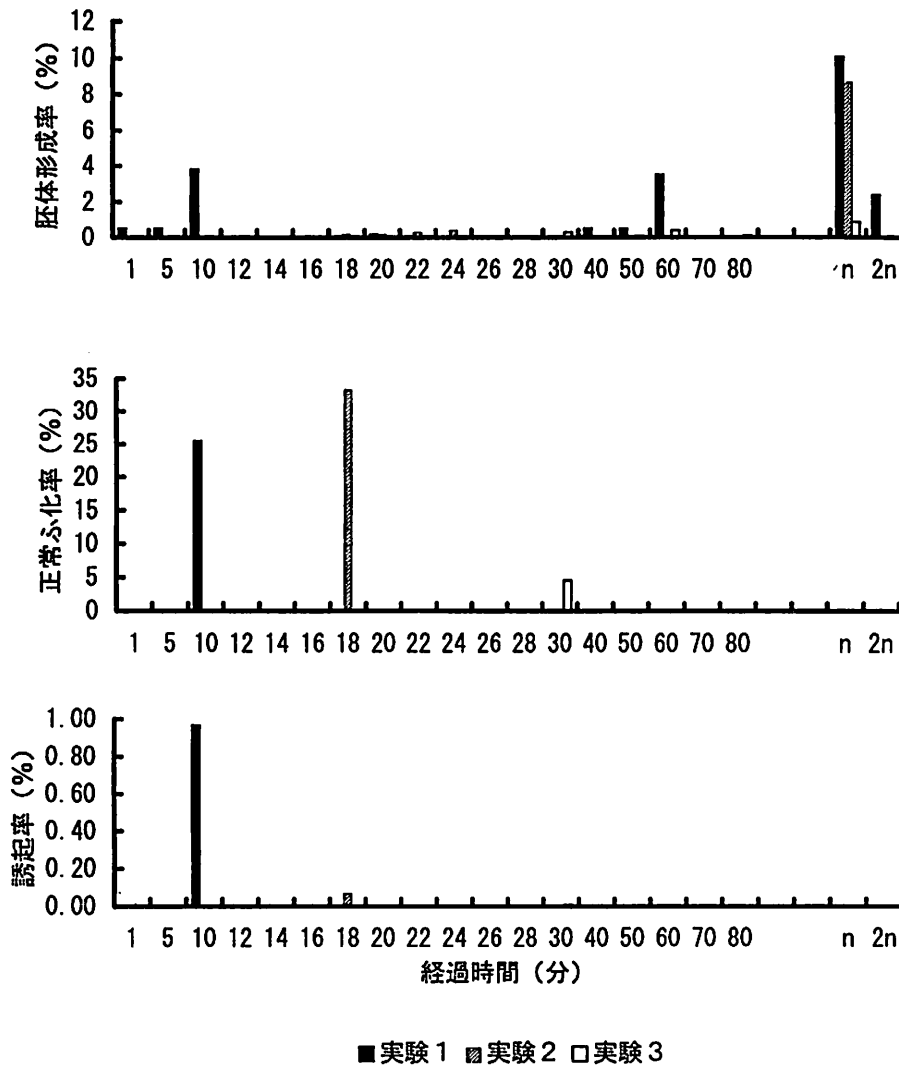


図2 圧力処理開始時間と胚体形成卵率、正常ふ化率、誘起率の関係

3. 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が、その誘起率は高いとは言えない。そこで、卵割阻止法と異なる方法を検討することにより誘起率の向上を試みた。今年度は、ポリエチレングリコール (PEG) によって精子を二つずつ融合させ、これを媒精した後に極体放出阻止をするという方法に着目し、精子の融合条件について検討した。

方 法

配合飼料で養成したオニオコゼ雄親魚より採精し、次に示す方法で融合を試みた。これら一連の試験に用いた精液は精子濃度 10^8 cells/mlに生理的塩類溶液 (BSS) で調製した。PEG溶液の調製はそれぞれ最終濃度となるようにPEGをBSSに溶解した。また対照区にはPEG溶液の代わりにBSSを用いた。

- 試験1： (1) 精液 2 mlを遠心管へ入れ、2,000rpm、3分間の遠心分離をした。
 (2) 上澄み液を捨て、20%、40%、60%のPEG 2,000溶液を1 mlずつそれぞれ異なる遠心管の3本ずつへ静かに加えた。

- (3) PEG溶液添加1、2、5分後にBSS 9 mlを加え2分間静置した。
- (4) BSSで3回洗浄した後、一部は精子挙動性の観察に、残りは2%パラホルムアルデヒド-2.5%グルタルアルデヒド固定液で固定し接着率の観察に供した。

試験2： PEG 4,000を用いて試験1と同じ試験区設定、同操作をした。

試験3： 20%、40%のPEG 6,000溶液を作製し他の操作及び試験区設定は試験1に準じた。

- 試験4： (1) 精液0.5mlずつ入れた遠心管へ最終濃度1%、2%、4%、8%、10%となるPEG 4,000溶液をそれぞれ個別に0.5mlずつ加えた。
- (2) 5分後にBSS 9 mlを加え、その後直ちに一部を精子挙動性の観察に、残りを2%パラホルムアルデヒド-2.5%グルタルアルデヒド固定液で固定し接着率の観察に供した。

- 試験5： (1) 精液0.5mlずつ入れた遠心管へ最終濃度8%、10%、15%、20%となるPEG 4,000溶液をそれぞれ個別に0.5mlずつ加え、1分間静置した。
- (2) PEG濃度が2%となるようにBSSを加え、その後新たに精液1 mlを加えた。
- (3) 2,000rpm、3分間の遠心をし、上澄み液を除去した。
- (4) BSS 10mlを加え、ピペットでゆっくり攪拌し、精子の挙動性と接着率の観察に供した。

- 試験6： (1) 精液0.5mlずつ入れた遠心管へ最終濃度10%となるPEG 4,000溶液を0.5mlずつ加え、1、5、10分間静置した。
- (2) 2,000 rpm、3分間の遠心後、BSS 9 mlを加え、ピペットでゆっくり攪拌した。そして精子の挙動性と接着率の観察に供した。

- 試験7： (1) 精液0.5mlずつ入れた遠心管へ最終濃度8%、10%となるPEG 4,000溶液をそれぞれ個別に0.5mlずつ加えた。
- (2) 直ちに2,500rpm、5分間の遠心をした。
- (3) そこへBSS10mlを直接加え、5分後に精子の挙動性と接着率の観察に供した。

- 試験8： (1) 精液を×10、×5、×2、×1にBSSで希釈し、これらの精液0.5mlへ最終濃度5%となるPEG 4,000溶液0.5mlを加えた。
- (2) 1分後にBSS 4 mlを加え、精子の挙動性と接着率の観察に供した。

- 試験9： (1) 精液を×10、×5、×2、×1にBSSで希釈し、これらの精液0.5mlへ最終濃度8%となるPEG 4,000の溶液0.5mlを加えた。
- (2) 10分後(試験9-1)、5分後(試験9-2)、1分後(試験9-3)にBSS 4 mlを加え、精子の挙動性と接着率の観察に供した。

- 試験10： (1) 精液を×10にBSSで希釈し、この精液2 mlを50mlサンプル瓶へ入れ、1,500rpm、4分間の遠心をした。
- (2) 上澄み液を除去し、10% PEG 4,000 2 mlを静かに加え、1、5、10分間

静置した。

- (3) それぞれへ新たに×10精液 1 mlずつを加え、直ちにBSS 9 mlを加えた。
- (4) その後1,500rpm、4分間の遠心をし、上澄みを除去した。
- (5) BSS 1 mlを加えた後に精子の挙動性と接着率の観察に供した。

試験11：(1) 試験10の操作において20% PEG 4,000溶液を用いた。

融合に関する評価はスライドガラスへ融合精液を塗沫しギムザ染色を施した後、位相差顕微鏡によって一定視野内に存在する通常精子、2精核精子(2精子接着精子)そして多精核精子(多精子接着精子)の数を計数し2精子接着率を求めた。2精核精子は精子頭部のみあるいは精子頭部と鞭毛の両方接着した精子を計数した。

更に処理をした精液へ一定濃度となるように海水を添加し、軽く攪拌後直ちにトーマ血球計算板に滴下して精子の挙動をビデオに撮影した。そしてこの映像を解析して精子活力指数を算出した。

その算出方法は顕微鏡の一定視野内の全精子を対象に、海水添加15秒後の1秒間に移動した距離を測定し次の5段階に運動能を分類し評価した。更にそれぞれの評価段階の存在率を求め、それらの段階に与えた評価値に乗じた。この乗数の総和を100で除した値を精子活力指数とした。

表1 精子運動能の評価段階と評価値

評 価 段 階		評 価 値
+++	80 μm < (著しく活発な前進運動を行うもの)	100
++	40 μm < ≤ 80 μm (活発な前進運動を示すもの)	75
+	0 μm < ≤ 40 μm (緩慢な前進運動をするもの)	50
±	小さな旋回または振り子運動を行うもの	25
-	運動を停止しているもの	0

*それぞれの評価段階が一定視野内にどれだけの割合で存在するかを求め、5段階評価に+++：100，++：75，+：50，±25，-：0なる数値を与え、これに掛け合わせた値を総計し、その値を100で割ったものを精子活力指数とした。例えば、70+++，30++，0+，0±，0-の場合は以下の通りとなる。

$$\begin{aligned} \text{精子活力指数} &= (100 \times 70 + 75 \times 30 + 50 \times 0 + 25 \times 0 + 0 \times 0) / 100 \\ &= 92.5 \end{aligned}$$

結果及び考察

精子の融合状態は完全な細胞質同士の融合は見られず、精子頭部の細胞膜あるいは鞭毛における接着であった。鞭毛のみで接着した精子は挙動が異常で直進運動をしない精子が多かった。2精核精子は直進運動をする物もあったが、多くは不規則な運動をしていた。試験1～4、6～9における精子全体に占める2精核精子の割合は非常に少なく、多精核精子が多かった。逆に試験5、10、11では未接着精子が多かった。2精子接着率はすべての試験区に於いて10%以下であった。

2精核精子を用いた4倍体の作出は、媒精した後に低温処理を行なう必要があり更に誘起率が低くなることが考えられる。また誘起されたふ化仔魚の遺伝的な性比率は、第1卵割阻止をした方法より雄側に偏ると考えられる。これらのことより、接着精子を用いた4倍体作出法は接着率や活力指数等の点から、第1卵割阻止法と比べ技術的課題が多いことが明らかとなった。

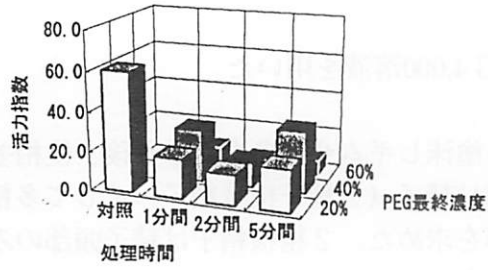


図3 試験1における精子活力指数

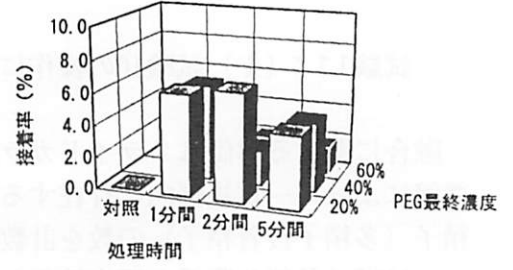


図4 試験1における2精子接着精子率

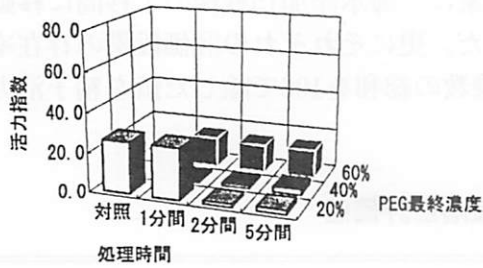


図5 試験2における精子活力指数

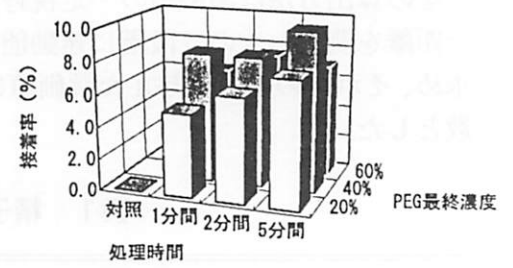


図6 試験2における2精子接着率

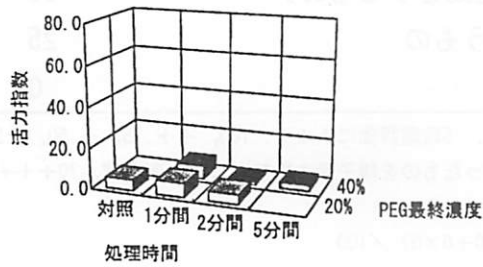


図7 試験3における精子活力指数

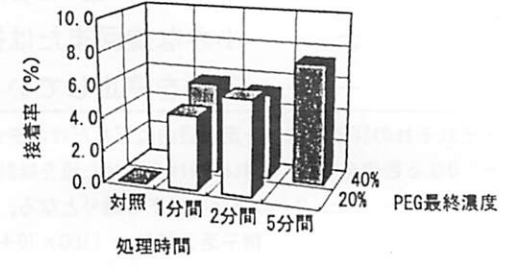


図8 試験3における2精子接着率

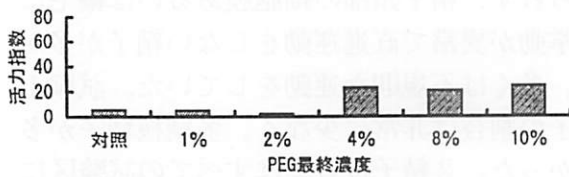


図9 試験4における精子活力指数

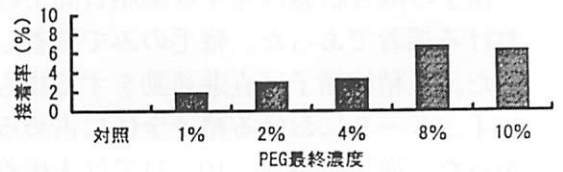


図10 試験4における2精子接着率

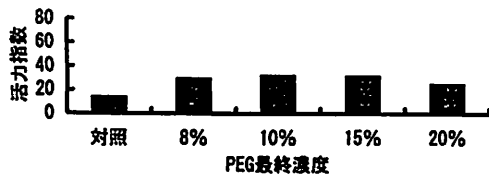


図11 試験5における精子活力指数

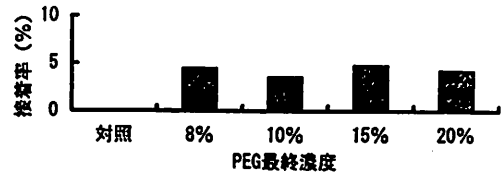


図12 試験5における2精子接着率

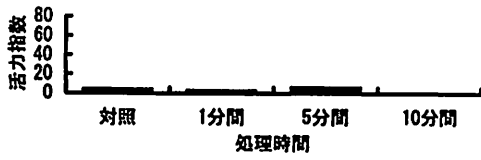


図13 試験6における精子活力指数

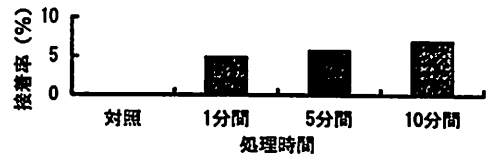


図14 試験6における2精子接着率

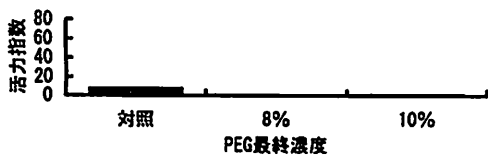


図15 試験7における精子活力指数

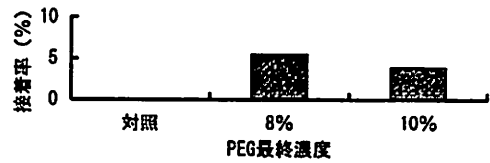


図16 試験7における2精子接着率

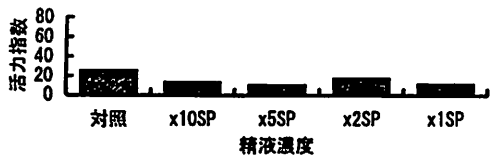


図17 試験8における精子活力指数

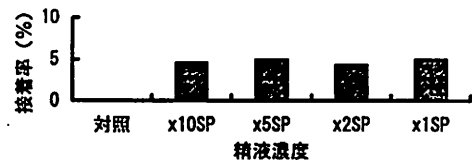


図18 試験8における2精子接着率

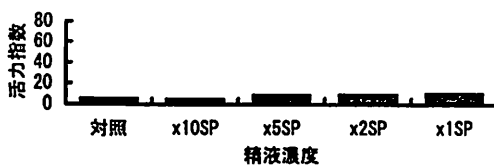


図19 試験9-1 (10分後)における精子活力指数

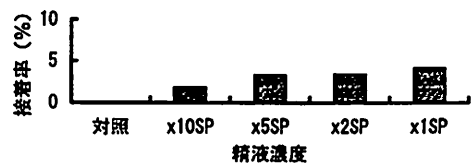


図20 試験9-1 (10分後)における2精子接着率

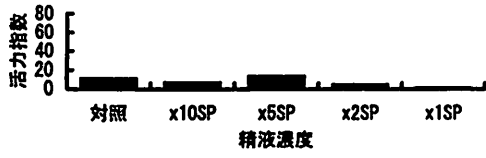


図21 試験9-2 (5分後)における精子活力指数

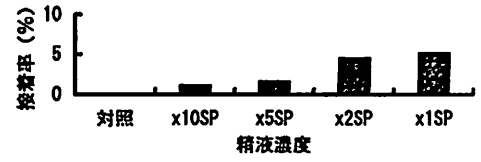


図22 試験9-2 (5分後)における2精子接着率

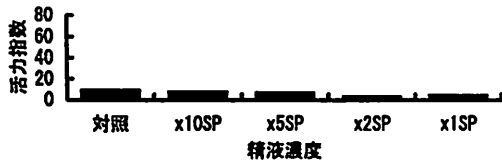


図23 試験9-3 (1分後)における精子活力指数

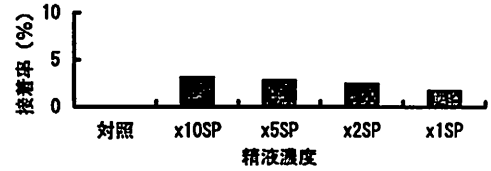


図24 試験9-3 (1分後)における2精子接着率

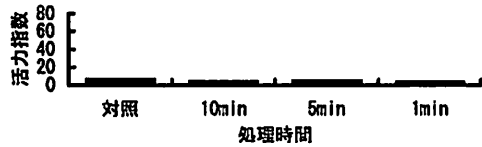


図25 試験10における精子活力指数

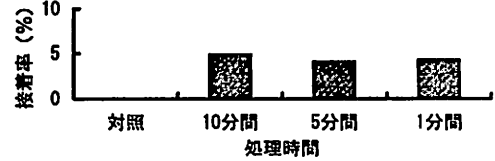


図26 試験10における2精子接着率

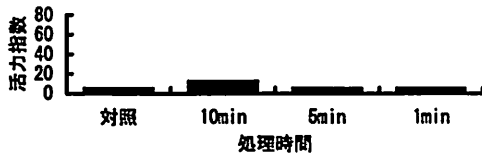


図27 試験11における精子活力指数

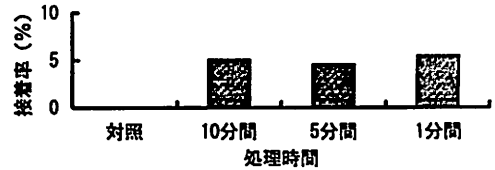


図28 試験11における2精子接着率

4. 精液保存方法の検討

オニオコゼの雄から採取できる精液は僅かで、これを有効に利用して試験の効率化をはかると共に、4倍体の偽雄を作出した際に採取された精液を保存する方法を確立する。

オニオコゼの精漿をイオンクロマトグラフィーで分析し人工精漿を作製した。また凍結保存の方法についても検討した。

方 法

(1) 精漿分析

配合飼料で養成したオニオコゼ雄親魚5尾より採精し、遠心分離によって精漿を得た。これを超純水で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。またグルコースの測定はレフロトロン (ペーリンガー・マンハイム社製) を用い、アルブミンはブロムクレゾールグリーン法に準じて検体を処理しダブルビーム分光光度計 UV-190 (島津製作所製) で測定した。また pH 測定には pHメータ HM-30V (東亜電波工業製) を用いた。

(2) 精液凍結保存試験

配合飼料で養成したオニオコゼ雄親魚数尾より採精し、精子濃度が 15×10^6 cells/ml となるように人工精漿で調整した。また人工精漿により凍結保護剤ジメチルスルホキシド (DM SO) の最終濃度が 2 ~ 20% の範囲で 2% ずつ濃度が増すように調製し、希釈精液をこの溶液で6倍に希釈した。更にそれぞれの濃度で平衡時間を 0 (希釈後すぐに凍結), 0.5, 1 分間と設定した。これをドライアイス上に 0.05ml ずつ滴下し凍結した後に液体窒素中に保存した。凍結48時間後に海水 0.1ml で融解し精子の挙動について観察した。運動精子の評価方法は精子融合試験に準じた。

結果及び考察

(1) 精漿分析

図29, 30はクロマトグラムで図31は分析結果の平均値を示した図である。

オニオコゼの精漿の Mg^{2+} 濃度は、マダイが 2.53mM/l であるのに対し 117.01mM/l と他の魚種に比べ著しく高い値を示した。

卵漿の成分組成は血漿のその影響を強く受けており、その濃度割合も血漿に近い。一般にあまり活発に遊泳しない魚種の血液は、 Mg^{2+} 濃度が高いという報告もあるが、オニオコゼの血漿の Mg^{2+} 濃度は 1.72mM/l と低く、この例に当たらない。従って、オニオコゼの精漿の Mg^{2+} 高濃度は精子の生理活動に何らかの影響を与えている可能性が考えられる。

分析結果から表 2 に示した人工精漿を作製し、凍結保存に使用した。

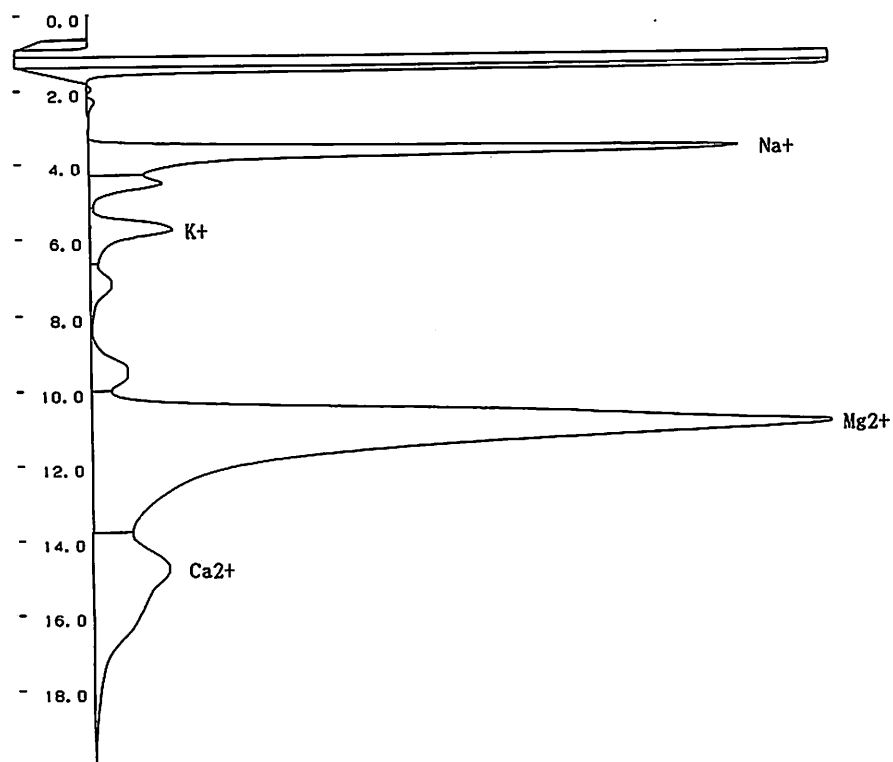


図29 陽イオンの分析結果

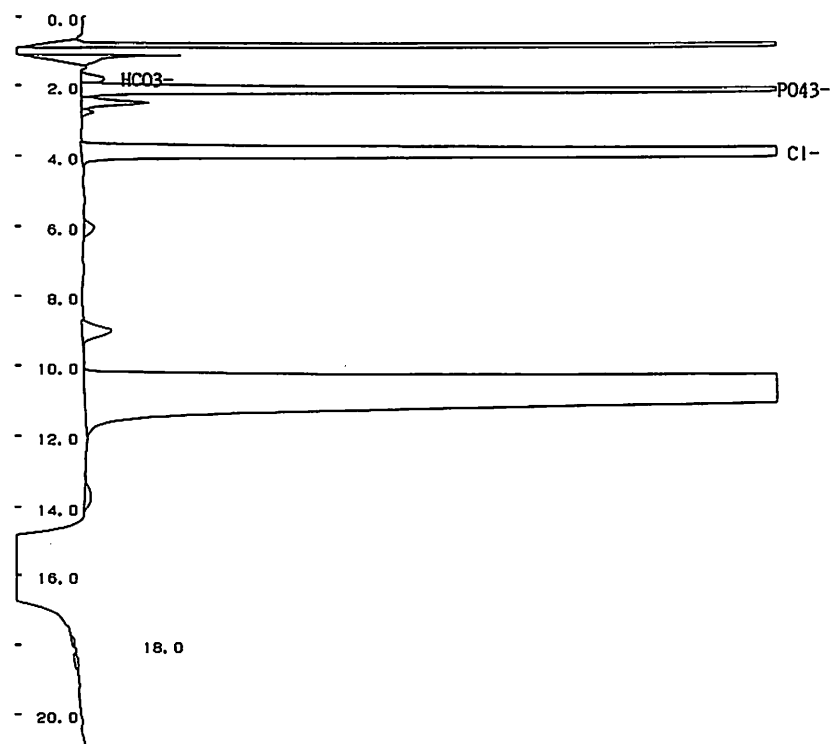


図30 陰イオンの分析結果

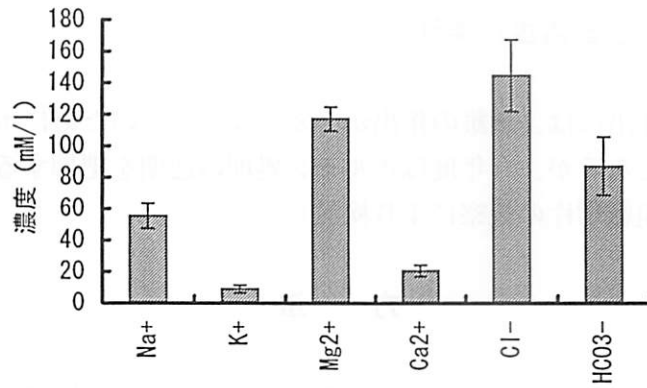


図31 オニオコゼ精漿の分析結果

表2 オニオコゼ人工精漿

	NaCl	KCl	MgCl ₂	CaCl ₂	NaHCO ₃	D-Glucose	Albumin	pH
(mM/l)	43.5	7.98	80.04	13.02	5.08			
(g/l)	2.542	0.595	7.621	1.445	0.427	0.19	5.04	7.03

(2) 精液凍結保存試験

凍結保存後で活力指数が良かった試験区はDMSO最終濃度8%—平衡時間0分間区の11.7であった。平衡時間が長くあるいはDMSO最終濃度が高くなると活力指数が減じる傾向にあった。またDMSO最終濃度が低濃度の場合にも同じことが言えた。前者の場合は、DMSO自体の毒性により精子が害され、後者の場合は凍結保護剤であるDMSOが十分にその役割を果たしておらず、凍結時に凍結障害を起こしたと考えられる。

活力指数が最も良かったDMSO最終濃度8%—平衡時間0分間区の凍結精液をオニオコゼ卵へ媒精したところ、胚体形成率は15.2%と低かったが、正常孵化率は75.2%と高かった。従って胚体形成率が低いのは、人工精漿の成分組成や浸透圧等の要因が大きいと思われた。

今後、精漿の浸透圧も調べ人工精漿の組成を再検討したいと思う。

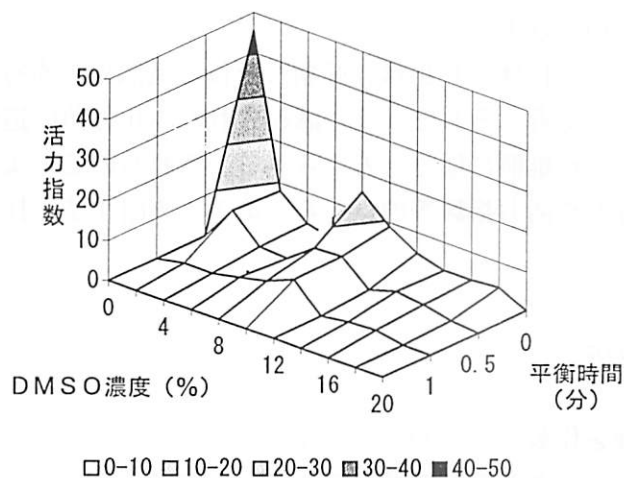


図32 DMSO濃度と平衡時間が精子活力へ与える影響

5. ホルモン処理による偽雄化条件

全雌3倍体の大量作出には、偽雄の作出が必要となる。そのためにホルモン処理による偽雄化する技術が必要となるが、今年度はホルモン処理の適期を把握するため、オニオコゼの性分化時期について組織切片の観察により検討した。

方 法

ふ化後数日おきにふ化仔魚を測定し、その後10%ホルマリンに固定した。これを定法のパラフィン包埋をし、マイヤーのヘマトキシリン-エオシン二重染色をした。

結果及び考察

現在これらのサンプルを観察中である。

IV 要 約

1. 第1卵割開始時期の観察

オニオコゼ卵(O)に通常のオニオコゼ精子(O)、UV照射オニオコゼ精子(UVO)そしてUV照射イシダイ精子(UVI)を用い、水温23℃付近での発生速度に違いが見られるかを検討した。すべての区で媒精50分後から卵割溝が観察され54分後付近でその割合が最高となった。精液の違いは発生速度に影響を与えなかった。

2. 圧力処理による第1卵割阻止条件

圧力処理の開始時間を検討したところ媒精10~30分後に処理をしたとき正常孵化仔魚を得ることが出来た。最も高い誘起率は0.97%であった。

3. 圧力処理型第1卵割阻止法以外による4倍体誘起方法

ポリエチレングリコール(PEG)によって精子を二つずつ融合させ、これを媒精した後極体放出阻止をするという方法に着目し、精子の融合条件について検討した。2精核精子数はすべての区で10%以下であった。

2精核精子を用いた4倍体の作出は、媒精した後に低温処理を行なう必要があり、更に誘起率が低くなることが考えられる。また誘起されたふ化仔魚の遺伝的な性比率は、第1卵割阻止をした方法より雄側に偏ると考えられる。これらのことより、接着精子を用いた4倍体作出法は接着率や活力指数等の点から、第1卵割阻止法と比べ技術的課題が多いことが明らかとなった。

4. 精液凍結保存方法

(1) 精漿分析

精液の希釈液を作製するために、イオンクロマトグラフィーで基本的なイオンの組成を分析した。またグルコース及びアルブミン含量も調べた。Na⁺: 55.4mM/l、K⁺: 8.88mM/l、Mg²⁺: 117.01mM/l、Ca²⁺: 20.52mM/l、Cl⁻: 144.53mM/l、HCO³⁻: 87.15mM/l、

グルコース：0.19g/l、アルブミン5.04g/l、pH7.03だった。オニオコゼの精漿はMg²⁺を高濃度に含んでおり、これは精子の生理活動に何らかの影響を与えている可能性が考えられた。

(2) 精液凍結保存試験

精漿分析結果を元に作製した人工精漿で一定濃度に精液を希釈した。また人工精漿によってDMSOの最終濃度が2～20%の範囲で2%ずつ濃度が増すように調製し、希釈精液をこの溶液で6倍に希釈した。更にそれぞれの濃度で平衡時間を0（希釈後すぐに凍結）、0.5、1分間と設定した。これをドライアイス上へ滴下して凍結し、その後液体窒素中に保存した。48時間後に融解して精子活力を観察したところDMSO最終濃度8%—平衡時間0分間区で活力が最もあった。この精液を卵へ媒精したところ胚体形成率は15.2%と低かったが、正常孵化率は75.2%だった。胚体形成率が低いのは、人工精漿の成分組成や浸透圧等の要因が大きいと思われた。

V 文 献

- (1) T.Ueda, M.Kobayashi, and R.Sato : Triploid rainbow trout induced by polyethylene glycol. *Proc. Japan Acad.* , **62**, 161-164 (1986)
- (2) K.Ueno and J.Idomoto : Fusion of spermatozoa with polyethylene glycol. *Nippon Suisan Gakkaishi* , **59**, 1355-1360 (1993)
- (3) 太田博巳, 松原孝博, 今田和史 : 体腔液及び洗卵液で希釈されたサクラマス精子の運動について, *水産増殖* , **37**, 235-239 (1989)
- (4) 黒倉寿 : 魚類の精子と卵の凍結保存. 「回遊の生物学」(森沢正昭, 会田勝美, 平野哲也編), 学会出版センター, 東京, 1987, pp. 222-234.
- (5) 一戸健司 : 人工授精. 「ライフサイエンスにおける性と生殖」(朝山新一, 林基之, 北川照男, 一戸健司著), 共立出版, 東京, 1986, pp. 166-214.
- (6) 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
- (7) 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