

クニマス代理親魚の成熟と採卵

岡崎 巧・平塚 匡・小澤 諒・加地奈々・三浦正之・藤原 亮*¹
・勘坂弘治*¹・市田健介*¹・Lee Seungki*¹・吉崎悟朗*¹

代理親魚とは、異種あるいは異個体由来の配偶子を生産する宿主のことを指し、免疫系が未発達な宿主、即ちふ化前後の仔魚にドナーの生殖細胞を移植することによって作出される¹⁾。また、魚類においては卵の凍結保存が不可能である一方で、代理親魚の作出に用いられる生殖細胞や生殖細胞を含む精巢は、長期間の凍結保存が可能であるため、絶滅危惧種や有用品種の遺伝資源の保存への応用が期待されている¹⁾。筆者らは、西湖で2011年に再発見されたクニマス *Oncorhynchus kawamurae* の域外保全策の一環として、本種の精巢の凍結保存を進めるとともに、本種における代理親魚技法の確立を目的とし、2013年度及び2014年度にクニマスの生殖細胞を近縁種へ移植することにより代理親魚を作出した^{2,3)}。これらの代理親魚について、2015年度から2017年度にかけて成熟状況を確認するとともに、得られた配偶子を用いてクニマスを作出したのでその状況を報告する。

なお、本研究は山梨県総合理工学研究機構研究課題の一環として実施した。

材料及び方法

供試した代理親魚は2013年に作出したサクラマス三倍体、ヒメマス三倍体、ニジマス雌×ヒメマス雄の異質三倍体（以下、ニジヒメ）及び2014年に作出したヒメマス三倍体で、2014年に作出した代理親魚は凍結保存されたクニマス精巢を用いて作出したものである^{2,3)}（表1）。

表1 供試した代理親魚の作出時の状況

移植年月日	ドナー精巢(クニマス)		代理親魚 (宿主として供した種)	移植尾数 (尾)	移植細胞の 生着率(%)
	凍結年月	個体数			
2013/10/16	凍結なし	5	サクラマス3n	144	14.3 (3/21) [※]
2013/10/17	凍結なし	5	ヒメマス3n	103	15.0 (3/20)
2013/11/6	凍結なし	4	ヒメマス3n	55	53.3 (8/15)
2013/11/6	凍結なし	4	ヒメマス3n	18	60.0 (3/5)
2013/11/7	凍結なし	4	ヒメマス3n	150	25.0 (5/20)
2013/11/12	凍結なし	2	ヒメマス3n	156	30.8 (12/39)
2013/11/28	凍結なし	3	ヒメマス3n	57	33.3 (5/15)
2013/11/28	凍結なし	3	ニジマス×ヒメマス3n	61	5.0 (1/20)
2013/12/25	凍結なし	6	ニジマス×ヒメマス3n	153	30.0 (6/20)
2014/11/14	2013/12	5	ヒメマス3n	106	5.0 (1/20)
2014/12/30	2013/12	11	ヒメマス3n	58	50.0 (5/10)
2014/12/30	2014/12	2	ヒメマス3n	86	60.0 (6/10)
2015/1/6	2014/10~12	2	ヒメマス3n	75	15.8 (3/19)

※:生着個体数/供試個体数

いずれの代理親魚についても、概ね満1歳時に腹腔内にピットタグ（Biomark社製）を挿入し、IDで個体識別できるように標識した。また2014年度作出群については、ピットタグに加え、各個体の両眼後方にイラストマー標識を施し、標識の色によって作出ロットを識別できるようにした。これらの標識を施した後、各ロットを作出年 Okazaki Takumi, Hiratsuka Tadashi, Ozawa Ryo, Kaji Nana, Miura Masayuki, Fujihara Ryo, Kanzaka Koji, Ichida Kensuke, Lee Seungki, Yoshizaki Goro *¹, 東京海洋大学

度、種毎にまとめ、山梨県水産技術センター忍野支所（以下、忍野支所）の屋内に設置した FRP 水槽（1.0m(W)×3.5m(L)×0.5m(D)）にそれぞれ収容した。このうち、2013 年度に作出したヒメマスは 2016 年 1 月 8 日に選別し、大群を屋外のコンクリート製池（9.5m(L)×3m(W)×0.5m(D)）に分養した。これらの水槽及び池にはいずれも 12.5℃の井水を掛け流し、自然日長下で飼育した。なお、2015 年度に行った熟度鑑別の結果、2013 年度作出群（3 歳）の成熟個体の出現率が低く、忍野支所における高水温（12.5℃）の影響が考えられたため、2017 年 3 月 14 日より、2014 年度に作出したヒメマスの全て（222 尾）を、忍野支所より飼育用水の水温が低い（10.6℃）東京海洋大学大泉ステーション（以下、大泉ステーション）へ移送し、屋外に設置した丸型ポリエチレン製水槽（1.4m(φ)×0.7m(D)）2 基及び角型 FRP 製水槽（2.3m(L)×0.9m(W)×0.7m(D)）1 基に収容し、湧水を掛け流して自然日長下で飼育した。また、忍野支所及び大泉ステーションにおける飼育水温をデータロガー（Tidbit, Onset 社）で記録した。

代理親魚の熟度鑑別は、2013 年度に作出したヒメマスが 2～4 歳、それ以外のものについては 2～3 歳時に実施し、いずれも秋季から冬季にかけて概ね週 1 回の頻度で実施した（表 2）。ここで鑑別開始時のニジヒメの飼育尾数が移植尾数（表 1）に比して大幅に減少しているのは、浮上までの間に水腫症が発生し、大量に減耗したためである。

表 2 各代理親魚の熟度鑑別実施期間と鑑別開始時の尾数

作出年度	代理親魚	熟度鑑別実施期間と鑑別開始時の尾数					
		2015年度		2016年度		2017年度	
		2015/9/16 - 2015/12/9	尾数	2016/8/8 - 2016/11/29	尾数	2017/9/12 - 2017/12/21	尾数
2013	サクラマス	2015/9/16 - 2015/12/9	103	2016/8/8 - 2016/11/29	88	2017/9/12 - 2017/12/21	44
	ヒメマス	2015/9/16 - 2015/12/9	292	2016/8/8 - 2017/1/11	260	2017/9/12 - 2017/12/21	3
	ニジヒメ			2016/8/8 - 2016/11/29	5	2017/9/12 - 2017/12/21	3
2014	ヒメマス			2016/9/27 - 2016/11/29	237	2017/9/4 - 2017/12/5	162

熟度鑑別の結果、排卵または排精する個体が確認された際には、尾柄部から採血して塗抹標本を作製し、赤血球径により三倍体であることを確認したうえで人工授精に供した。また、雄の一部の個体の精液は液体窒素中で凍結保存した。凍結保存と解凍の方法は、土居ら⁴⁾または Ciereszko *et al.*⁵⁾の方法に準じた。代理親魚より得られた配偶子の種判別は、精子については、直接精子から抽出した DNA をテンプレートとし、ミトコンドリア DNA のクニマス種特異的配列を増幅する PCR 法⁶⁾により行った。卵については、発生途中の胚から DNA を抽出し、精子と同じ PCR 法により判別した。なお、代理親魚からの卵が得られなかった 2015 年度は、忍野支所で養成したクニマス 4 歳魚から得た卵を人工授精に供した。また、代理親魚からの精子が得られなかった 2017 年度は、前年に凍結保存した代理親魚の精子を人工授精に供した。

結 果

2015 年度

2013 年度に作出したサクラマス及びヒメマス 2 歳魚の熟度鑑別を行った結果、サクラマス雄 6 尾が排精、雌 2 尾が排卵し、ヒメマスは雌 1 尾が排卵した。排精したサクラマス雄 6 尾は、赤血球長径からいずれも三倍体であると判定され、PCR 法による種判別の結果、これら 5 尾のうち 3 尾の精子がドナー細胞由来のクニマス精子と判別された（表 3、図 1）。排卵したサクラマス雌 2 尾及びヒメマス雌 1 尾は、赤血球長径から二倍体と判定されたため、これらの卵は宿主由来のものと考えられた。

クニマス精子と判別された代理親魚（サクラマス）の精子を、通常のクニマス卵と人工授精したところ、卵質に起因して生残率が悪かったものの、クニマスふ化仔魚 3 尾が得られた（表 4、図 2）。

表3 2015年度の熟度鑑別結果

代理親魚	排精・排卵 確認日	ID	全長 (mm)	体長 (mm)	体重 (g)	赤血球長径 (平均±SD, μm)	倍数性 ^{※1}	PCR判別結果 ^{※2}
2013年度産サクラマス♂	2015/8/27	4449	-	-	-	21.1±0.9	3n	+
	2015/8/27	6897	370	321	552	20.3±1.5	3n	-
	2015/9/9	F19D	-	-	-	21.0±1.5	3n	-
	2015/9/9	28FC	-	-	-	21.4±1.3	3n	+
	2015/9/9	5940	-	-	-	20.9±1.5	3n	-
	2015/9/9	5DDE	-	-	-	21.4±1.6	3n	+
2013年度産サクラマス♀	2015/9/9	43CA	-	-	-	16.6±1.0	2n	
	2015/9/9	W038	-	-	-	15.5±0.9	2n	
2013年度産ヒメマス♀	2015/9/30	W036	-	-	-	17.9±1.1	2n	

※1 赤血球長径の平均または最大値が20μmを超えるものを三倍体と判定した

※2 +:クニマス陽性, -:クニマス陰性

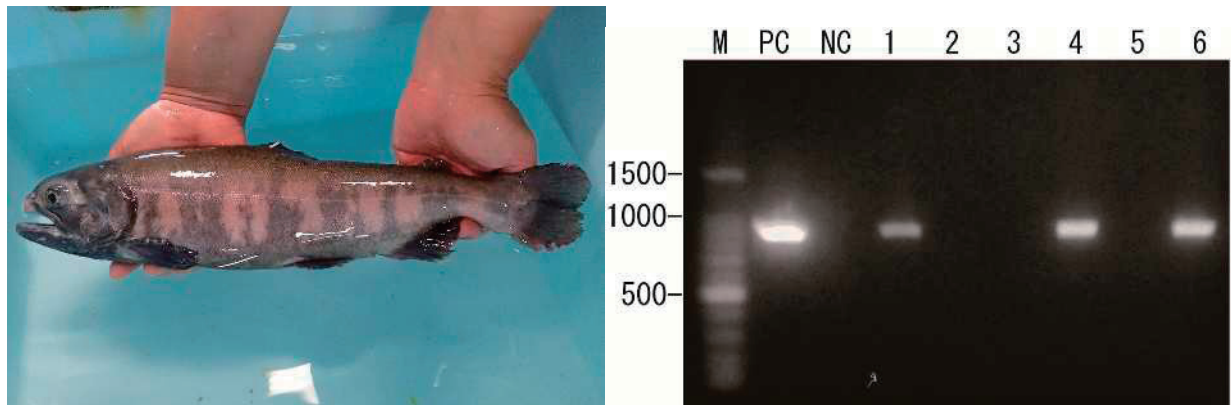


図1 クニマスの精子を排精した代理親魚（2013年作出サクラマス4449, 写真左）と同精子のPCR法による種判別結果（写真右）

M:分子量マーカー, PC:クニマス脂鱈, NC:サクラマス脂鱈,

1:2013年作出サクラマス精子ID:4449(クニマス+), 2:同6897, 3:同F19D, 4:同28FC(クニマス+), 5:同5940, 6:同5DDE(クニマス+)

表4 通常のクニマス卵と代理親魚(サクラマス)から得たクニマス精子による人工授精の結果

受精日	雌親魚 (通常個体)	雄親魚※ (代理親魚)	供試 卵数	発眼 卵数	発眼率 (%)	ふ化 尾数	ふ化率 (%)	浮上 尾数	浮上率 (%)	備考
2015/11/11	2011年度産クニマス (ID:A087)	2013年度産サクラマス (ID:4449)	100	3	3.0	0	0	-	-	凍結保存した精子 を使用
		2013年度産サクラマス (ID:28FC, 5DDE)	776	13	1.7	2	0.3	2	0.3	精子は2個体分を プールして使用
2015/11/25	2011年度産クニマス (ID:A091)	2013年度産サクラマス (ID:28FC)	347	15	4.3	1	0.3	1	0.3	
2015/11/27	2011年度産クニマス (ID:A091)	2013年度産サクラマス (ID:28FC)	256	2	0.8	0	0.0	-	-	

※ 代理親魚の精子はいずれもPCR法によりクニマス陽性を確認したものをを使用した



図2 通常のクニマス卵と代理親魚（サクラマス）から得たクニマス精子の人工授精により作出したクニマス稚魚（撮影：2016年2月）

2016年度

2013年度に作出したサクラマス、ヒメマス、ニジヒメ3歳魚と2014年度に作出したヒメマス2歳魚の熟度鑑別を行った結果、2013年度に作出したサクラマス雄5尾が排精し、PCR法による種判別の結果、2尾から得た精子がドナー細胞由来のものであった。また、このうち1尾は前年度にも排精した個体であった。2013年度に作出したヒメマスは、雄2尾、雌5尾の排精と排卵を確認した。さらに2014年度に作出したヒメマス2歳魚の雄1尾の排精を確認した。これらヒメマスの精子は種判別の結果、いずれもドナー細胞由来と判別された(表5, 図3)。

排卵したヒメマス5尾から得た卵と精子を用いて人工授精を行ったところ、2尾から得た卵の一部が発眼期まで発生したものの、小眼、矮小などの異常が見られ、ふ化仔魚を得ることはできなかった。これらの胚からDNAを抽出してPCR法による種判別を行ったところ、いずれもドナー細胞由来の卵であることが確認された(表6, 図4)。なお、残り3尾より得た卵については、発生が進まなかったため、PCR法による種判別は行っていないが、このうち2尾から得た卵は三倍体の代理親魚のものであり、忍野支所で飼育中のヒメマス三倍体が一切卵を持たないことから、これらはドナー細胞由来の卵である可能性が高いと考えられた。

2013年度に作出したニジヒメについては、成熟個体は出現しなかった。

表5 2016年度の熟度鑑別結果

代理親魚	排精・排卵 確認日	ID	全長 (mm)	体長 (mm)	体重 (g)	赤血球長径 (平均±SD, μm)	倍数性 ^{※1}	PCR 判別結果 ^{※2}	備考
2013年度産サクラマス♂	2016/8/30	F19D	-	-	-	20.9±1.5	3n	-	前年排精個体・精液薄い
	2016/8/30	5940	-	-	-	20.3±1.5	3n	-	〃
	2016/8/30	5DDE	352	295	498	21.4±1.6	3n	+	前年排精個体
	2016/9/6	487A	375	333	634	20.7±1.3	3n	+	
	2016/9/6	4637	377	331	628	22.1±1.6	3n	-	精液薄い
2013年度産ヒメマス♂	2016/8/23	2B29	376	334	639	21.4±1.6	3n	+	
	2016/8/30	49B3	439	380	1,023	20.7±1.4	3n	+	
2013年度産ヒメマス♀	2016/9/6	6842	435	384	1,190	23.0±1.3	3n	-	
	2016/9/13	5817	348	308	385	22.0±1.1	3n	+	種判別は発眼卵胚で実施
	2016/9/13	467E	373	326	459	21.3±2.0	3n	+	〃
	2016/9/27	2276	367	312	419	21.3±1.4	3n	-	
	2016/10/25	45B5	331	290	330	-	-	-	採血不実施
2014年度産ヒメマス♂	2016/9/27	2791	287	242	259	21.7±1.2	3n	+	

※1 赤血球長径の平均または最大値が20μmを超えるものを三倍体と判定した

※2 +:クニマス陽性, -:クニマス陰性

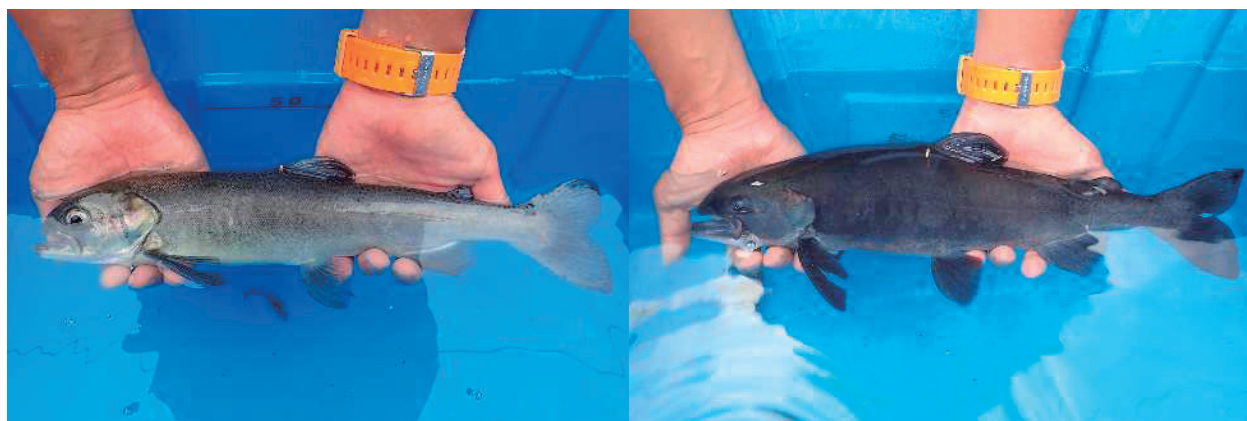


図3 クニマス配偶子を排卵、排精した代理親魚（2013年度作出ヒメマス、左：雌 ID:5817、右：雄 ID:2B29）

表6 代理親魚から得た配偶子による人工授精の結果

受精日	雌代理親魚	雄代理親魚※	供試卵数	発眼卵数	発眼率 (%)	ふ化尾数	ふ化率 (%)	備考
2016/9/13	2013年度産ヒメマス (ID: 6842)	2013年度産サクラマス (ID: 5DDE)	143	0	0	-	-	
	2013年度産ヒメマス (ID: 5817)	2013年度産ヒメマス (ID: 2B29)	284	0	0	-	-	
		2013年度産サクラマス (ID: 5DDE)	267	1	0.4	0	0	小眼・胚体矮小
	2013年度産ヒメマス (ID: 467E)	2013年度産ヒメマス (ID: 49B3)	317	6	1.9	0	0	小眼・胚体矮小
2016/9/27	2013年度産ヒメマス (ID: 2276)	2013年度産サクラマス (ID: 5DDE)	322	12	3.7	0	0	小眼・胚体矮小
		2013年度産ヒメマス (ID: 2B29)	198	0	0	-	-	
2016/10/25	2013年度産ヒメマス (ID: 45B5)	2013年度産サクラマス (ID: 487A)	595	0	0	-	-	

※ 代理親魚の精子はいずれもPCR法によりクニマス陽性を確認したものをを使用した

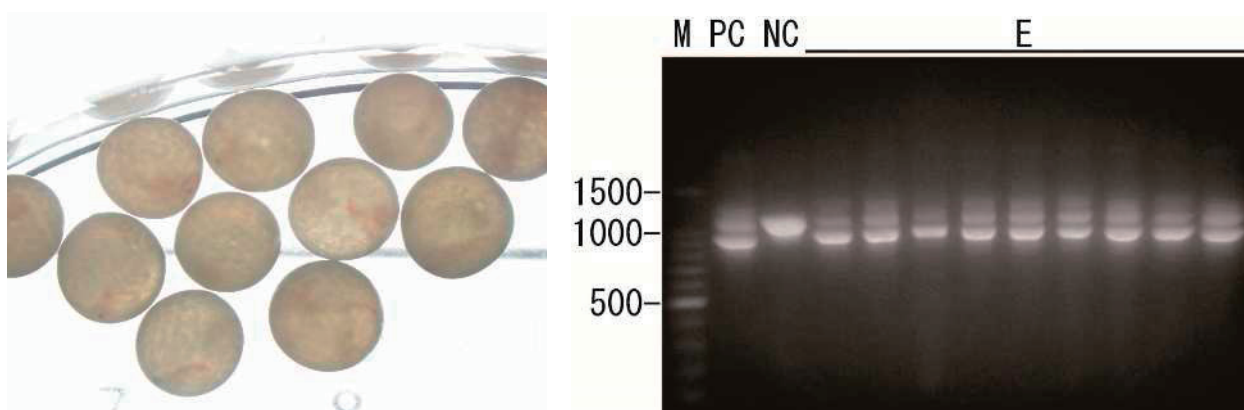


図4 代理親魚から得た発眼卵（写真左、小眼・胚体矮小）と同PCR種判別結果（写真右）

M:分子量マーカー, PC:クニマス脂鱭, NC:雌代理親魚脂鱭（ヒメマス 467E）,

E:代理親魚配偶子により作出した発眼卵（ヒメマス 467E×サクラマス 5DDE）

2017 年度

2013 年度に作出し、忍野支所で継続して飼育したヒメマス 4 歳魚及び 2014 年度に作出し、2017 年 3 月から大泉ステーションにて飼育したヒメマス 3 歳魚の熟度鑑別を行った結果、前者については成熟する個体は出現しなかった。一方、後者のヒメマス 3 歳魚については、雌 3 尾が排卵したが雄の排精個体は出現しなかった（表 7）。

排卵した 3 尾はいずれも三倍体であることを確認のうえ採卵し、2016 年度に雄の代理親魚（ヒメマス 2 歳魚及びサクラマス 3 歳魚）より得たクニマス凍結精子で人工授精したところ、1 尾から得た卵が正常に発生した。発眼卵の一部を用いて種判別を行ったところ、クニマス陽性であることが確認され、ドナー細胞由来の配偶子によるクニマスふ化仔魚 61 尾が得られた（表 8、図 5,6）。また、残り 2 尾より得た卵についても、三倍体から得た卵であるためドナー由来の卵である可能性が高いと考えられた。大泉ステーションにおける飼育用水の水温は 8.2～12.7℃（平均 10.6℃）で、忍野支所の 11.3～14.5℃（平均 12.6℃）に比べ年間を通して低かった（図 7）。

2013 年度に作出したニジヒメについては、成熟個体は出現しなかった。

表 7 2017 年度の熟度鑑別結果

代理親魚	排精・排卵 確認日	ID	全長 (mm)	体長 (mm)	体重 (g)	赤血球長径 (平均±SD, μm)	倍数性※1	PCR 判別結果※2	備考
2014年度産ヒメマス♀	2017/10/17	DE30	353	314	667	22.0±1.3	3n	+	種判別は発眼卵胚で実施
	2017/10/17	DE72	354	315	589	20.7±1.1	3n		
	2017/11/6	DE03	372	330	663	21.0±1.3	3n		

※1 赤血球長径の平均または最大値が20μmを超えるものを三倍体と判定した

※2 +:クニマス陽性, -:クニマス陰性

表 8 代理親魚から得た配偶子による人工授精の結果

受精日	雌代理親魚	雄代理親魚 (凍結精子使用)	供試 卵数	発眼 卵数	発眼率 (%)	ふ化 尾数	ふ化率 (%)	浮上 尾数	浮上率 (%)	備考
2017/10/18	2014年度産ヒメマス (ID: DE30)	2014年度産ヒメマス (ID: 2791)	256	46	18.0	24	9.4	10	3.9	
		2013年度産サクラマス (ID: 487A)	235	51	21.7	37	15.7	20	8.5	
	2014年度産ヒメマス (ID: DE72)	2014年度産ヒメマス (ID: 2791)	254	0	0	-	-	-	-	
2017/10/24	2014年度産ヒメマス (ID: DE72)	2013年度産サクラマス (ID: 487A)	28	0	0	-	-	-	-	雌親魚採卵2回目
2017/11/7	2014年度産ヒメマス (ID: DE03)	2014年度産ヒメマス (ID: 2791)	345	0	0	-	-	-	-	卵巣左葉未成熟



図 5 クニマス卵を排卵した代理親魚（ヒメマス DE30、写真左）代理親魚から得た配偶子により作出したクニマスふ化仔魚（写真右、ヒメマス DE30×サクラマス 487A）

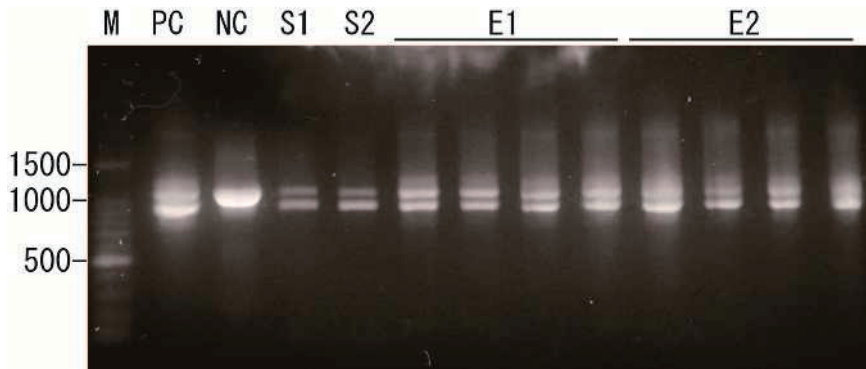


図6 代理親魚の配偶子を用いて作出した発眼卵のPCR法による種判別結果
M：分子量マーカー，PC：クニマス脂鱭，NC：雌代理親魚脂鱭（ヒメマス DE30），
S1：雄代理親魚精子（ヒメマス 2791），S2：雄代理親魚精子（サクラマス 487A），
E1：代理親魚配偶子により作出した発眼卵（ヒメマス DE30×ヒメマス 2791），
E2：代理親魚配偶子により作出した発眼卵（ヒメマス DE30×サクラマス 487A）

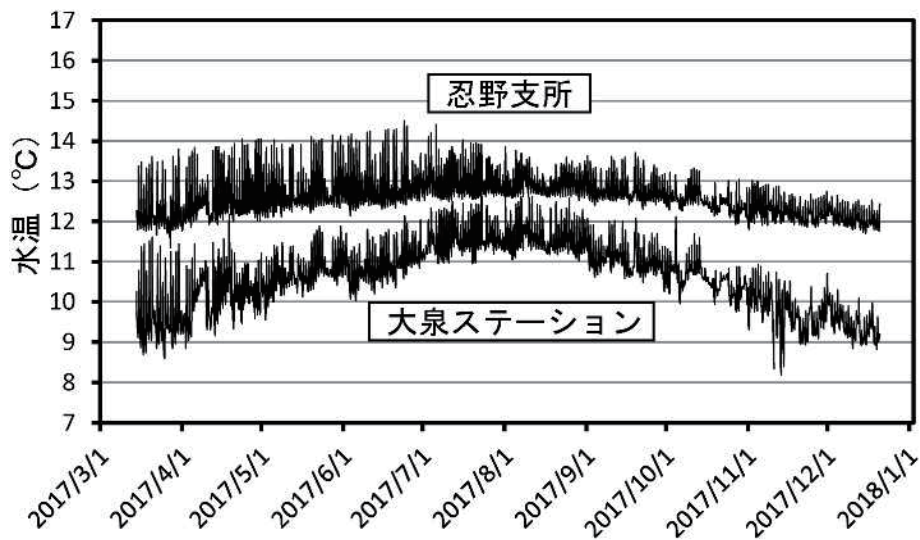


図7 大泉ステーション屋外FRP水槽及び忍野支所屋外コンクリート池の水温の推移

考察

本研究の結果、代理親魚として用いたヒメマスがクニマス卵と精子を、また、サクラマスがクニマス精子を生産し、これらの配偶子を用いたクニマス作出が可能であることを示した。

一方、用いたいずれの代理親魚においても成熟する個体の出現率が低いうえ、卵の生残率が低いことが課題として残った。各代理親魚のうち、成熟してドナー細胞由来の配偶子を生産したものの割合は、鑑別開始時の飼育尾数に対し、いずれも3%未満であり、代理親魚作出時の移植細胞の生着率が5~60%（平均24.8%、表1）であったことを踏まえると低率であった。また、2016年度には、2013年産のヒメマス3歳魚から得た配偶子を用いてクニマスの作出を試みたものの、正常に発生が進まず、ふ化仔魚を得ることができなかった。ここで使用した精子を通常のヒメマスと交配したところ、いずれも問題なく発生が進むことを確認しているため（未発表データ）、ふ化仔魚が得られなかった理由は主に卵質に起因するものと見られる。

このように成熟個体の出現率が低く、得られた卵の質が悪かったことは、本報告書で別途報告したクニマス池

産養成親魚の状況⁷⁾と良く似ており、クニマスでは、忍野支所における飼育水温が本種の成熟適水温に比べ高いことがその要因と考えられている。一方、本研究で宿主に用いたヒメマスは、忍野支所における種苗生産対象種として毎年問題なく生産されており、宿主にヒメマスを用いることで、クニマスで見られたような高水温による成熟抑制や卵質低下といった問題も解消できるものと期待していたが、結果はクニマスの状況と同様であった。ここで、代理親魚の成熟や卵質の良否を左右したのは、宿主ではなくドナーであるクニマスの性質を引き継いだ結果とも考えられたため、2014年に作出したヒメマスを、2017年3月から忍野支所に比べ飼育用水の水温が約2度低い大泉ステーションに移送して親魚養成した。同年9月から行った熟度鑑別の結果、雌3尾が排卵し、これらの卵に代理親魚から得たクニマス凍結精子で人工授精したところ、1尾から得られた卵が正常に発生し、ドナー細胞由来の配偶子により61尾のクニマスふ化仔魚を得ることに成功した。このことは大泉ステーションにおける低水温飼育による結果とも考えられるが、正常に発生した卵は1尾から得られたもののみであり、依然として成熟個体の出現割合は低いままである。

また、本研究では宿主としての適性を知るため、3種の三倍体魚を用いて代理親魚を作出したが、成熟に適した条件が明らかになっていないなかで、この点についても十分な知見を得ることができなかった。今後は、これらを踏まえ、代理親魚の成熟に適した環境要因や宿主として用いる種の適性等について引き続き検討することとし、クニマスにおける代理親魚技法の確立を目指すこととしたい。

謝 辞

本研究を行うにあたり、山梨県水産技術センター忍野支所の羽田幸司主任技能員ほか臨時職員の方々には実験魚の飼育管理を行っていただいた。また、東京海洋大学大泉ステーションの三井拓也技官、佐久間賢志技官ほか学生諸氏には実験にあたり種々の便宜を図っていただいた。これらの方々には心より謝意を表します。

要 約

1. 2013年度及び2014年度に作出したクニマス代理親魚の成熟状況について検討するとともに、得られた配偶子を用いてクニマスの作出を試みた。
2. 2015年度に行った熟度鑑別の結果、2013年度に作出したサクラマス雄2歳魚3尾がドナーであるクニマス生殖細胞由来の精子を生産した。また、これらの精子を通常のクニマス卵と交配したところ、3尾のクニマスふ化仔魚が得られた。
3. 2016年度に行った熟度鑑別の結果、2013年度に作出したヒメマス雄3歳魚2尾、同雌5尾、サクラマス雄3歳魚2尾がドナー細胞由来の配偶子を生産した。これらの配偶子によりクニマスの作出を試みたものの、卵質が著しく悪く、ふ化仔魚を得ることはできなかった。その要因として、忍野支所における飼育水温が成熟適水温に比べ高いことが考えられたため、2017年3月に2014年度に作出したヒメマス2歳魚を忍野支所より飼育水温の低い大泉ステーションに移送して親魚養成した。
4. 2017年度に、大泉ステーションにて養成したヒメマス3歳魚の熟度鑑別の結果、ヒメマス雌3歳魚3尾が排卵し、前年に代理親魚より得られた凍結精子で人工授精したところ、雌1尾から得た卵が正常に発生し、61尾のクニマスふ化仔魚が得られた。

文 献

- 1) 吉崎悟朗 (2015) : 代理親魚技法の構築とその応用に関する研究. 日本水産学会誌, 81(3), 383-388.
- 2) 青柳敏裕・岡崎 巧・加地奈々・大浜秀規・長谷川裕弥・勘坂弘治・市田健介・吉崎悟朗 (2014) : クニマスの生態解明及び増養殖に関する研究 (第2報) . 山梨県総合理工学研究機構研究報告書, 9, 49-65.
- 3) 青柳敏裕・岡崎 巧・大浜秀規・三浦正之・谷沢弘将・小澤 諒・長谷川裕弥・吉澤一家・坪井潤一・勘坂弘治・市田健介・Lee Seungki・吉崎悟朗・松石 隆 (2015) : クニマスの生態解明及び増養殖に関する研究 (第3報) . 山梨県総合理工学研究機構研究報告書, 10, 43-65.
- 4) 土居隆秀・福富則夫・尾田紀夫 (1994) : ヒメマスの精液凍結保存技術開発試験－凍結容器として 1mL 容ストロー管を使用した保存－. 栃木県水産試験場研究報告, 38, 39-40.
- 5) Ciereszko, A., Dietrich G. J., Nynca J., Dobosz S., Zalewski T. (2014) : Cryopreservation of rainbow trout semen using a glucose-methanol extender. *Aquaculture.*, 420-421, 275-281.
- 6) Nakayama, K., Muto, N., Nakabo, T. (2013) : Mitochondrial DNA sequence divergence between “Kunimasu” *Oncorhynchus kawamurae* and “Himemasu” *O. nerka* in Lake Saiko, Yamanashi Prefecture, Japan, and their identification using multiplex haplotype-specific PCR. *Ichthyological Research*, 60(3), 277-281.
- 7) 岡崎 巧・平塚 匡・小澤 諒・加地奈々・三浦正之 (2019) : クニマス池産養成親魚 (3～6 歳) の成熟と採卵－2015～2017 年度の結果－. 山梨県水産技術センター事業報告書, 46, 印刷中.