



Title	染色体操作により得られたニジマス2系統の耐病性ならびに再生産形質に見られた差異
Author(s)	望月, 万美子; 阿久津, 哲也; 鴻上, 繁 他
Citation	日本水産学会誌, 73(5), 844-850 https://doi.org/10.2331/suisan.73.844
Issue Date	2007-09-15
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/53382
Rights	© 2007 公益社団法人日本水産学会
Type	journal article
File Information	article142.pdf



染色体操作により得られたニジマス 2 系統の耐病性 ならびに再生産形質に見られた差異

望月万美子,^{1,3*} 阿久津哲也,^{1a} 鴻上 繁,² 岡本信明,² 吉水 守³

(2006 年 11 月 8 日受付, 2007 年 3 月 23 日受理)

¹静岡県水産試験場富士養鱒場, ²東京海洋大学, ³北海道大学大学院水産科学研究院

Differences observed in disease tolerance and reproduction trait of two rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* strains by chromosome manipulation

MAMIKO MOCHIZUKI,^{1,3*} TETSUYA AKUTSU,^{1a} SHIGERU KOGAMI,²
NOBUAKI OKAMOTO² AND MAMORU YOSHIMIZU³

¹Fuji Trout Hatchery, Shizuoka Prefectural Fisheries Experimental Station, Fujinomiya, Shizuoka 418-0108,

²Tokyo University of Marine Science and Technology, Minato, Tokyo 108-8477, ³Graduate School of Fisheries Science, Hokkaido University, Hakodate, Hokkaido 041-8611, Japan

Two rainbow trout strains (RT92H04 and RT92H10) were gained by chromosome manipulation from infectious hematopoietic necrosis (IHN) tolerant selected rainbow trout at Fuji Trout Hatchery, Shizuoka Prefectural Fisheries Experimental Station. Disease tolerance and reproduction trait of these strains were investigated.

Though IHN tolerant, RT92H10 had low resistance to *Vibrio anguillarum* infection. On the other hand, RT92H04 was *V. anguillarum* infection tolerant and had low resistance to IHN. RT92H04 grew slowly but matured at the age of two. RT92H10 took three years to mature, although it grew relatively fast.

These results revealed that these strains may be useful as breeding stock or immunological experimental fish.

キーワード: IHN, 系統間差, 再生産形質, 染色体操作, 耐病性, ニジマス, ビブリオ病

ニジマス *Oncorhynchus mykiss* は明治 10 年に北米より移入されて以来, 日本各地で養殖が行われている。他の魚介類と同様, 養殖の発展に伴い疾病, 特にウイルス病の被害が大きな問題となっている。¹⁾ 中でも伝染性造血器壊死症 (IHN) は 1970 年に北米から輸入したベニザケ卵とともにわが国に侵入し,²⁾ 1974 年に長野, 静岡両県下のニジマスに発生が認められて以来各地で蔓延している。本疾病は腎臓と脾臓, 特に腎臓の造血組織に激しい壊死を起こし,³⁾ 稚魚期の累積死亡率が 80% にまで達することもある非常に被害の大きな疾病である。また近年では, 出荷サイズ的大型魚も発症することも問題となっている。このように産業的に被害の大きい本疾病に対して, 発眼卵消毒や飼育施設の消毒, 感受性を有する稚魚期の隔離飼育が行われているが, 防疫対策以外に有効な対策がないのが現状である。

このような状況のもと, 養殖現場からはワクチンの開発とともに, 耐病性系統の作出が切望されている。家禽など他の動物では選抜による遺伝的改良の効果が得られているが, 養殖魚においてはごく最近まで遺伝的な選抜がほとんど行われてこなかった。⁴⁾ また, 従来の選抜育種では形質の固定に 20 世代以上もの継代が必要なことから,^{5,6)} 形質を固定するまでの時間を短縮できる染色体操作法が遺伝的改良に貢献すると考えられている。⁷⁾ しかし, これまでにクローンを作出したという報告⁷⁻¹¹⁾ や, 通常選抜により作出された系統の形質について比較検討したものはいくつかあるが,^{4,12-14)} 染色体操作により作出した系統の形質を比較したものはほとんどない。

本研究では, 静岡県水産試験場富士養鱒場において IHN 耐病系確立を目的として継代飼育してきたニジマス群を用いてクローンニジマスを作出し, クローン性を

* Tel : 81-544-52-0311. Fax : 81-544-52-0312. Email : mamiko1_mochizuki@pref.shizuoka.lg.jp

^a 現所属 : 静岡県水産試験場 (Shizuoka Prefectural Fisheries Experimental Station, Numazu, Shizuoka 410-0102, Japan)

確認するとともに、その耐病性形質ならびにクローンニジマスの成長性について調べ、IHN耐病性系統作出の可能性について検討した。

試料および方法

クローンニジマスの作出 供試親魚にはIHN耐病系確立のため静岡県水産試験場富士養鱒場で継代飼育されてきたニジマス群（富士養鱒場継代飼育群）を用いた。第一卵割阻止型雌性発生クローン^{15,16}は理論上、雌性発生を2世代繰り返して施すことで作出される（Fig. 1）。すなわち、富士養鱒場継代飼育群の中から1992年に得られた卵と、紫外線照射（6000 erg/mm²）により遺伝的に不活化したアルビノ精子を媒精し、約7時間水温10℃の流水中で管理した後第一卵割阻止（加温処理：30℃に加温した止水中に受精卵を5分間浸漬）を行うことでホモ接合魚（第一卵割阻止魚：G1）を作出した。1995年に満3歳魚となったホモ接合魚を用いて同様の方法で媒精し、約10分後に加温処理（27℃止水中に受精卵を15分間浸漬）することにより第二極体放出阻止魚を作出し、理論上のクローン魚（G2）を2系統得た。得られた2系統のクローンは作出年度と親魚番号により、RT92H04およびRT92H10と名付けた。クローン魚の継代は、第二極体放出法あるいは性転換雄を用いたクローン魚間の交配により行った。本研究には第2世代：G2（耐病性形質）と、第3世代：G3（再生産形質）

を供試し、供試魚のクローン性の確認は後述のDNAフィンガープリント法により行った。

クローン性の確認 RT92H04, RT92H10 および通常魚を無作為に3尾抽出し供試魚として用いた。ゲノムDNAはフェノール法により肝臓から抽出し、制限酵素HaeⅢあるいはMspⅠで消化後0.8% TBEアガロースゲルで30 V, 20時間泳動し、ナイロンメンブレンへとアルカリトランスファーした後、紫外線によりメンブレンとクロスリンクを行った。サザンハイブリダイゼーションは、メンブレン100 cm²あたり20 mLのハイブリダイゼーション液（5×SSC, 1% ブロッキング試薬, 0.1% N-ラウロイルサルコシン, 0.02% SDS, 0.1 mg/mL poly (A)）で68℃1時間のプレハイブリダイゼーションを行い、プローブを4 pmol/mLの終濃度で加えた新たなハイブリダイゼーション液（メンブレン100 cm²あたり2.5 mL）で45℃, 16~24時間行った。

プローブはDIGオリゴヌクレオチド・テイリングキットに従い、ジゴキシゲニンでテール標識した（GGAT）4のオリゴヌクレオチドを用い、シグナルの検出は前述のキットに従い発光法により行った。

人為感染試験による耐病性評価

1. IHN 人為感染試験 平均体重0.5~0.6 gのニジマス2系統（RT92H10, RT92H04）と対照群の全雌群を有効水量1.5 Lの角型水槽に収容し、飼育水にIHNV（GH7701株）を 3.4×10^3 TCID₅₀/mLになるよう添加

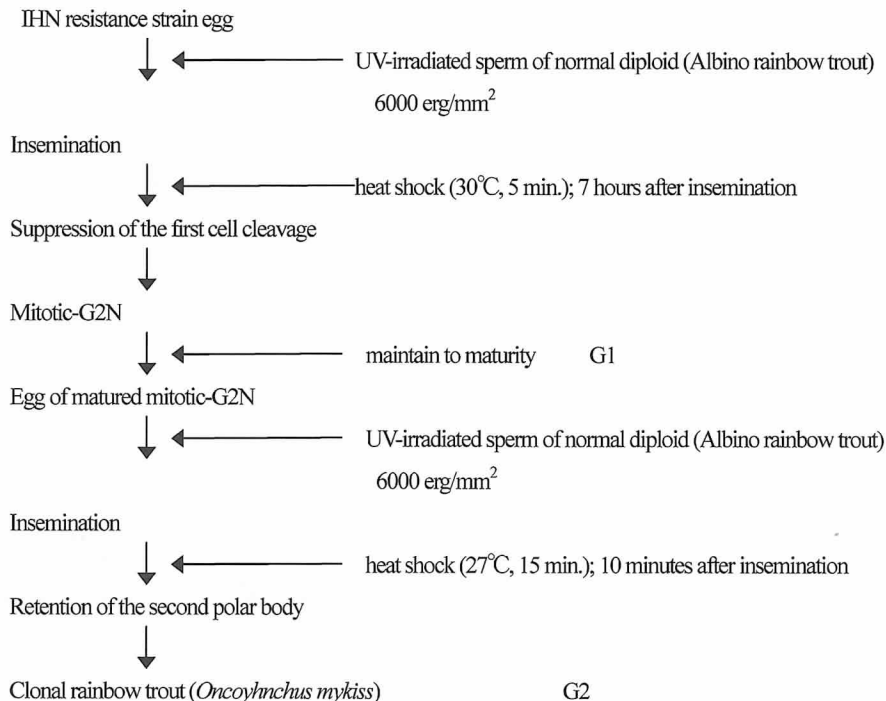


Fig. 1 Schematic diagram of the production of homozygous and clonal fish. The procedure was divided into two steps G1 and G2 (gynogenesis of the first and the second generation).

し、止水中で60分間浸漬攻撃を行った。攻撃後は水温13°Cに加温した湧水を換水率3回転/時になるように注水し、飼育を行った。なお、給餌は1日3回稚魚用市販飼料（富士製粉社製）を飽食量与え、41日間経過を観察した。

2. ビブリオ病人為感染試験 有効水量80Lの角型水槽に平均体重54~68gのニジマス2系統(RT92H10, RT92H04)と対照群として通常ニジマス群を各区30尾収容し、*Vibrio anguillarum* (9803株)を1尾あたり 4.0×10^3 CFU/mL/100gになるように腹腔内に接種して、人為攻撃を行った。陰性対照区にはPBSを同様に接種した。攻撃後は、水温14°Cに加温した湧水を3回転/時の換水率になるように注水し、給餌は1日2回市販飼料（富士製粉社製）を飽食量与えた。16日間経過を観察した。死亡魚は直ちにTSA培地を用いて腎臓からの細菌分離を行い、分離菌は抗ビブリオA型血清（水産庁診断用抗血清）を用いた載せスライドグラス凝集反応により*V. anguillarum*であることを確認した。

NK活性の測定 500Lの流水式水槽で、市販の飼料を与えて飼育した平均魚体重180gのクローンニジマス(RT92H10, RT92H04)を用いた。

NK活性は、Percoll (Pharmacia) による平衡遠心分離により得た比重1.090 g/mLの細胞をエフェクター細胞として、YAC-1 (Molony virus induced T-cell lymphoma) を標的細胞としたLDH法により測定した。なお、エフェクター細胞は細胞障害試験前に25°Cで約12時間インキュベートし、試験直前にトリパンブルーによる色素排除試験で細胞生存率90%以上であることを確認した。また細胞障害試験は、標的細胞数は 1×10^5 cells/mLとし、E:T (エフェクター細胞: 標的細胞) 比を25:1および50:1とし、15°C 8時間の条件で行った。細胞障害率の算出は以下の計算式により算出した。

Cytotoxicity (%) =

$$\frac{(\text{Test OD} - \text{Effector OD}) - \text{Spontaneous OD}}{\text{Maximum OD} - \text{Spontaneous OD}} \times 100$$

ここで、Spontaneous ODはエフェクター細胞の代わりに1.4 mM 炭酸水素ナトリウム、100 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシン、1% FBS 添加フェノールレッド不含RPMI-1640培地 (GIBCO) (以下RPMI-1とする)を100 µl加えたもの、Effector ODは標的細胞の代わりにRPMI-1を100 µl加えたもの、Maximum ODは同様に2% Triton X-100 (Sigma)を100 µl加え、well中の標的細胞を全て破壊したものである。

クローンニジマスの再生産形質 成長の比較のため、平均魚体重約50gのニジマス2系統 (RT92H10,

RT92H04)を個別の有効水量80Lのネオランバー製角型水槽 (水温10°C, 換水率3回転/時)に45尾ずつ収容し、198日間飼育を行った。給餌はライトリッツの給餌率に従い、1日3回残餌が出ないように市販の配合飼料 (富士製粉社製)を与えた。また、原則として毎月1回、全飼育個体の体重を個体毎に測定した。

さらに生後2年目の成熟状況を比較するため、前述の成長試験に用いた2系統のニジマスについて、試験終了後も同条件で飼育を継続し、成熟の判定を行った。産卵期である10月下旬に採卵可能な個体を確認して以降、成熟の判定を行い、翌年の2月には全ての個体を開腹し、魚体重と卵巢重量を測定した。また、その期間の死亡魚についても同様の測定を行った。生殖腺指数 (GSI) は以下の式によって求めた。

$$\text{GSI} = \text{卵巢重量} / \text{魚体重} \times 100$$

結 果

作出されたクローンニジマスについて 得られた2系統のクローンについてそのクローン性について調べたところ、制限酵素 *Hae* III および *Msp* I において通常魚では個体毎に異なるバンドパターンを示したが、クローンは系統内では同一のバンドパターンであった。また系統間では異なるパターンを示したことからRT92H04およびRT92H10はクローン魚であることが確認された。

クローンニジマスのIHN耐病性形質 上記2系統のクローンニジマスRT92H04, RT92H10を用いたIHN人為感染試験の結果をFig. 2に示した。試験終了時の対照区, RT92H04, RT92H10の死亡率はそれぞれ100%, 96%, 70%となった。累積死亡率の推移を見ると、ウイルス感染区はいずれの区も感染後約1週間から死亡が始まり、3週間ではほぼ終息した。しかしRT92H10群は、他の区の死亡がほぼ終息した29日目以降に死亡

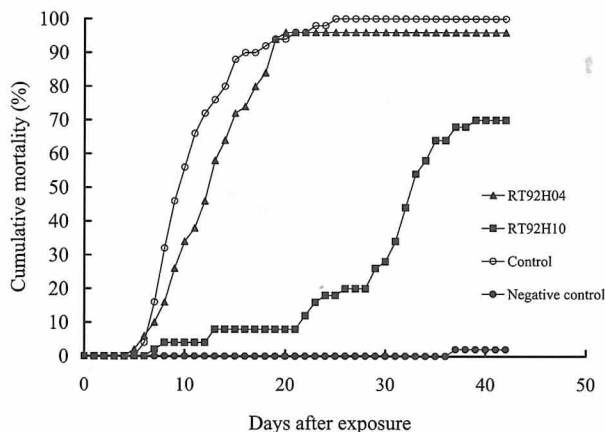


Fig. 2 Cumulative mortality of two rainbow trout strains infected with IHN by water-borne exposure. Exposing dose: 3.4×10^3 TCID₅₀/mL, 60 min.

数が増加した。また、攻撃区における全ての死亡魚から IHN ウイルスが検出された。

RT92H10 の死亡率は RT92H04 と比較すると有意に低かった (χ^2 検定: $p < 0.05$)。

クローンニジマスのビブリオ病耐病性形質 上記2系統のクローンニジマス RT92H04, RT92H10 を用いたビブリオ病人為感染試験の結果を Fig. 3 に示した。

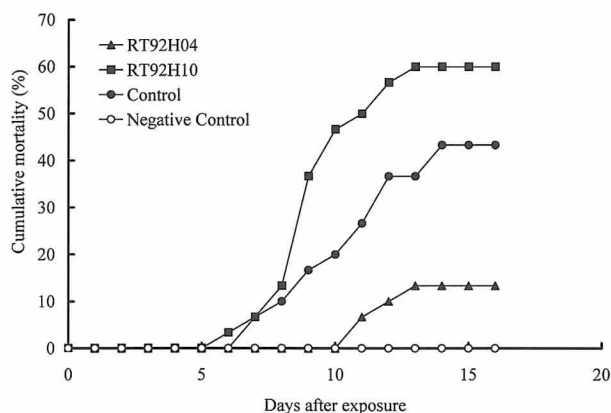


Fig. 3 Cumulative mortality of two rainbow trout strains infected with *Vibrio anguillarum* by i.p. injection.

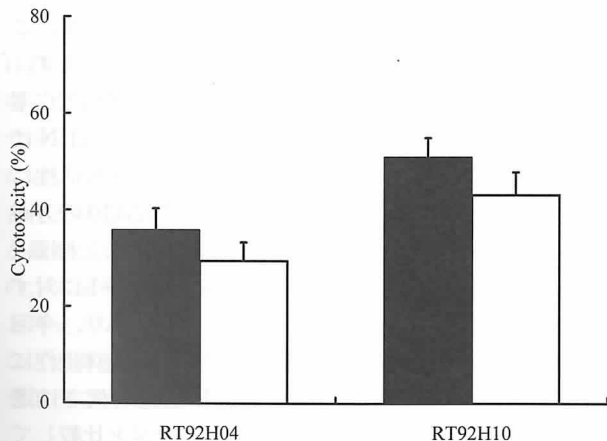


Fig. 4 Natural killer activity of two rainbow trout strains.

■ 50 : 1; □ 25 : 1.

*student's *t*-test ($p < 0.05$).

試験終了時の死亡率は RT92H10, 対照区, RT92H04 の順に高く (Table 1), それぞれ 60%, 43%, 13% であった。また、陰性対照区の死亡率は 0% であった。次に累積死亡率の推移を見ると, RT92H10 と対照区は感染後 5 日から死亡が始まったが, RT92H04 の死亡は 10 日目から始まり, 他の区に比べて若干遅い傾向が見られ, 試験区間の死亡率に有意な差 (χ^2 検定: $p < 0.05$) が見られた。死亡魚の細菌分離を行ったところ, 全ての死亡魚から *V. anguillarum* が分離された。

NK 活性 2 系統のクローン群について, YAC-1 に対する NK 活性を測定した結果を Fig. 4 に示した。RT92H04 の NK 活性は E : T = 50 : 1 で $35.9 \pm 4.4\%$ (mean $\pm$ S.E.M.; standard error of the mean, $n=8$), 25 : 1 で $29.4 \pm 3.8\%$ であった。それに対して, 系統の異なるクローン RT92H10 の NK 活性は $50.9 \pm 4.0\%$ 及び $43.0 \pm 4.7\%$ となり, RT92H10 は RT92H04 と比較

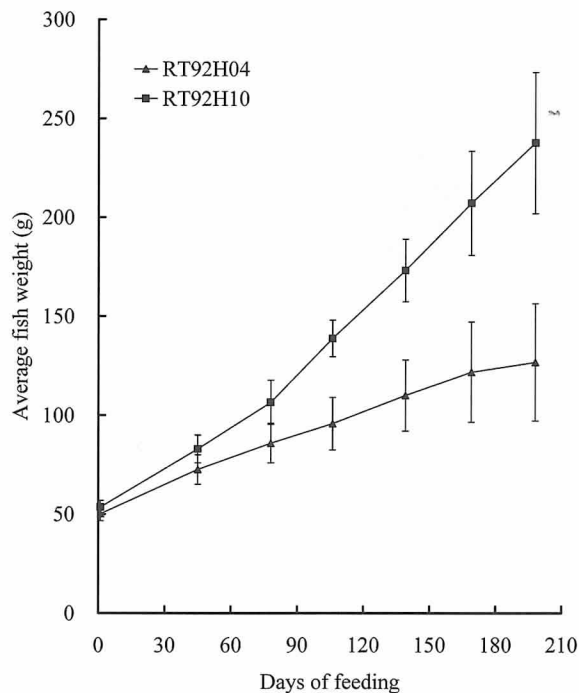


Fig. 5 Average weight of two rainbow trout strains fed at a fixed rate.

Table 1 Results of *Vibrio anguillarum* infectivity trials on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) strains

Challenge dose CFU/mL	Fish strain	Weight g	Number of survivors	Mortality %	Agglutination
4.01×10^3	RT92H04	54.3	26	13.3*	+
	RT92H10	58.9	12	60.0*	+
	Control	68.2	19	43.3*	+
—	Negative control	54.0	30	0	

* : $p < 0.05$ (Parson's χ^2 -test)

Table 2 Performance indices of two rainbow trout strains fed at a fixed feeding rate

Strain	Initial average weight (g)	Final average weight (g)	FCR ^a	Feed intake (kg)	Daily growth rate ^b (%/day)	Cumulative mortality (%)
RT92H10	53.6	237.7	66.9	11.3	0.77	6.7
RT92H04	50.1	126.8	33.9	8.7	0.47	11.0

^a FCR (feed conversion ratio) = feed fed (g)/weight gain (g) × 100

^b Daily growth rate = log (final average weight (g)/initial average weight (g)) × 230/rearing period (days)

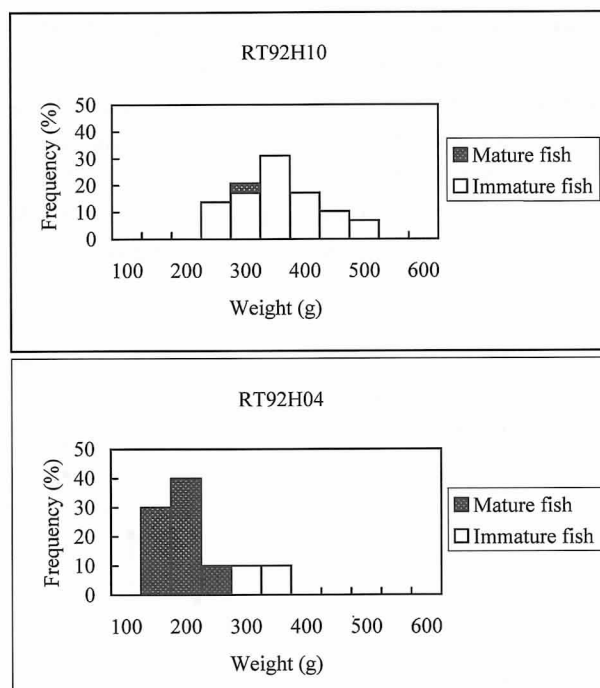


Fig. 6 Body weight distribution of two rainbow trout strains during the spawning period at the age of two.

して有意に高いNK活性を示した (t 検定 $p < 0.05$)。

クローンニジマスの再生産形質 成長について、各系統の平均魚体重の推移を見ると (Fig. 5), RT92H04の成長はRT92H10と比較して最初から遅く、77日目以降は特にその傾向が顕著になった。試験終了時の平均魚体重を見るとRT92H10が237.7 g, RT92H04が126.8 gでありRT92H10はRT92H04の2倍程度にまで成長した (Table 2)。また飼料効率および日間成長率も同様の傾向を示し、こちらもRT92H10の方が良い結果となったことから、RT92H10の成長の良さは飼料効率に起因していると考えられた。飼育期間中の死亡率はRT92H04では11%, RT92H10は6.7%であった。

次いで、生後2年目の成熟状況について各群における魚体重の頻度分布とGSIの状況についてFig. 6に示した。採卵期である10月下旬には、RT92H04はこの年採卵可能な個体のほとんどで排卵が確認できたが、RT92H10では成熟個体は見られなかった。RT92H10

の排卵が最初に確認されたのは11月中旬であり、産卵期についてRT92H04の方がRT92H10と比較して若干早い傾向が見られた。成熟魚の出現頻度は、RT92H04が80%であるのに対し、RT92H10は3.4%であった。また排卵時の魚体重は、RT92H04が141.9~212.3 gであり、ニジマスの成熟体重としてはかなり小さかった。しかし、魚体重250 g以上のものは成熟していなかった。

考 察

今回の試験では、第一卵割阻止法および第二極体放出阻止法により染色体操作を2世代施すことにより、ニジマス2系統RT92H04およびRT92H10を作出した。またそのクローン性をDNAフィンガープリント法で確認したところクローン系統であると考えられたため、耐病性ならびに再生産形質について調べた。その結果、これら系統が異なる性質を持つことが示された。まず、IHN人為感染による結果では、RT92H10の累積死亡率がRT92H04 (96%)と比較して低く (70%), IHNに対する抵抗性が高いことが示された。また、NK活性についても系統間で有意な差が見られ、RT92H10の方が高い活性を示していた。郡司(未発表データ)によれば、由来の異なる近交系ニジマス群2系統のYAC-1に対するNK活性に差が生じたことが報告されており、今回の試験でも同様の結果が得られた。また、染色体操作によって作出したisogenic lineではNK活性の低さは遺伝的に受け継がれており、¹⁷⁾野生型ニジマスと比較してクローン群のNK活性における個体差が小さい(鴻上, 阿久津, 未発表データ)との結果も示されている。さらに、NK細胞は哺乳類ではウイルス感染細胞の排除に寄与することが報告されており、ニジマスにおいてもNK様活性を有する白血球がウイルス防御に関与することが示唆されている¹⁸⁾ことから、NK活性が遺伝形質でありIHN抵抗性に何らかの影響を与えている可能性があると考えられる。

一方ビブリオ病に関しては、RT92H10の人為感染による累積死亡率が60%であるのに対し、RT92H04は13.3%とRT92H10の抵抗性が低い結果となった。RT92H04はRT92H10と比較して血漿コレステロール

濃度が有意に高く、人為的に血漿コレステロール濃度を低下させるとピブリオ病に感染しやすくなる(阿久津, 私信)ことから、ピブリオ病に対する抵抗性と血漿コレステロール濃度には何らかの関係があることが考えられる。これは、血漿コレステロール値が養殖魚の細菌感染症に対する抗病性の指標として有用である¹⁹⁾という従来の報告とも一致している。

今回の試験ではRT92H10と比較して成長が遅いRT92H04の大部分の個体(80%)が2年で成熟する一方で、RT92H10はほとんどの個体が未成熟という結果が得られた。これは個体の成熟に影響を与えるものとして、成長のほかに遺伝の影響が考えられるとした加藤²⁰⁾や、アマゴの池中飼育群に見られる相分化の割合が系統によって異なる^{21,22)}という報告にも支持されており、これら2系統の成熟は遺伝的関与が非常に強いと考えられる。系統内での体サイズで比較すると、RT92H04は比較的大きな個体が成熟していなかった。魚では、個体の成熟するための条件として、最低限ある大きさに成長することが必要である²³⁾と言われている。また、サケ科魚類の成長と成熟の関係についてはこれまでに多くの研究がなされており、²⁴⁻²⁷⁾体サイズの大きいものほど早く成熟すると考えられている。本報ではこれらの報告とは異なる結果となったが、原因については今後詳細に調べる必要があろう。

今回の試験により、当场で保有するニジマス2系統は様々な形質に関して異なる特徴を持つことが明らかとなった。クローン性に関してはその後行われたマイクロサテライトマーカーを用いた報告(有門, 未発表データ)において、クローン系統ならば全ての遺伝子座でホモ接合性が確認されるはずが、一部遺伝子座にヘテロ接合性が観察されたため完全なクローン性を疑われてはいるものの、本研究結果からはこれら系統は遺伝的に均質であると考えられた。今後これら系統はマーカー選抜育種²⁸⁾などの育種学的研究や、免疫学的研究などで重要な役割を担うことになると思われる。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、試験魚の飼育補助をしていただいた静岡県水産試験場の植松久男氏および職員各位に感謝いたします。また、本研究の一部は農林水産技術会議の地域先端技術等地域実用化研究促進事業により実施しました。ここに記して感謝を申し上げます。

文 献

- 吉水 守, 笠井久会. 魚類ウイルス病の最前線 その現状と防除対策. 化学と生物 2005; **43**: 48-57.
- Yoshimizu M. Disease problems of salmonid fish in Japan caused by international trade. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 1996; **15**: 533-549.
- Amend DF, Yasutake WT, Mead RW. A hematopoietic virus disease of rainbow trout and sockeye salmon. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 1969; **98**: 796-804.
- Overturf K, Casten MT, LaPatra SL, Rexroad IIIC, Hady RW. Comparison of growth performance, immunological response and genetic diversity of five strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 2003; **217**: 93-106.
- 谷口順彦. 染色体操作の遺伝学的意義. 「水産増養殖と染色体操作」(鈴木 亮編) 恒星社厚生閣, 東京. 1989; 104-117.
- Nagoya H, Okamoto H, Nakayama I, Arai K, Onozato K. Production of Androgenetic Diploids in Amago Salmon *Oncorhynchus masou ishikawae*. *Fish. Sci.* 1996; **62**: 380-383.
- Han HS, Taniguchi N, Tsujimura A. Production of clonal Ayu by chromosome manipulation and confirmation by isozyme marker and tissue grafting. *Fish. Sci.* 1991; **57**: 825-832.
- Streisinger G, Walker C, Dower N, Knauber D, Singer F. Production of clones of homozygous diploid zebrafish. *Nature* 1981; **291**: 293-296.
- Naruse K, Ijiri K, Shima A, Egami N. The production of cloned fish in the medaka (*Oryzias latipes*). *J. Exp. Zool.* 1985; **236**: 335-341.
- Bongers ABJ, Abo-Hashema EPCin't K, Bremmer IM, Eding EH, Komen J, Richter CJJ. Androgenesis in common carp (*Cyprinus Carpio* L.) using UV irradiation in a synthetic ovarian fluid and heat shocks. *Aquaculture* 1994; **122**: 119-132.
- Kobayashi T, Ide A, Hiasa T, Fushiki S, Ueno K. Production of Cloned Amago Salmon *Oncorhynchus rhodurus*. *Fish. Sci.* 1994; **60**: 275-281.
- 谷口順彦, 松本聖治, 小松章博, 山中弘雄: 同一条件下で飼育された由来の異なるマダイ5系統の質的および量的形質に見られた差異. 水誌 1995; **61**: 717-726.
- Valent LMP, Le Bail P-Y, Gomes EFS, Fauconneau B. Hormone profile in first- and slow- growing strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in response to nutritional state. *Aquaculture* 2003; **219**: 829-839.
- Kause A, Ritola O, Paananen T, Wahlroos H, Mäntysaari EA. Genetic trends in growth, sexual maturity and skeletal deformations, and rate of inbreeding in a breeding programme for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 2005; **247**: 177-187.
- Purdon CE, Thompson D, Lou YD. Genetic engineering in rainbow trout, *Salmo gairdnerii* Richardson, by the suppression of meiotic and mitotic metaphase. *J. Fish Biol.* 1985; **27**: 73-79.
- 荒井克俊. 染色体操作. 「魚類のDNA分子遺伝学的アプローチ」(青木 宙, 隆島史夫, 平野哲也編) 恒星社厚生閣, 東京. 1997; 32-62.
- Ristow SS, Grabowski LD, Wheeler PA, Prieur DJ, Thorgaard GH. Arlee line of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exhibits low levels of nonspecific cytotoxic cell activity. *Dev. Comp. Immunol.* 1995; **19**: 497-505.
- Yoshinaga K, Okamoto N, Kurata O, Ikeda Y. Individual variations of natural killer activity of rainbow trout leucocytes against IPN virus-infected and uninfected RTG-2 cells. *Fish Pathol.* 1994; **29**: 1-4.
- Maita M, Satoh K, Fukuda Y, Lee HK, Winston JR, Okamoto N. Correlation between plasma component levels of cultured fish and resistance to bacterial infection.

- Fish Pathol.* 1998; **33**: 129-134.
- 20) 加藤禎一. ニジマス成長と再生産諸形質の関係. 淡水研報 1975; **25**: 83-115.
- 21) 田代文男, 高橋 誠, 天野 賢. アマゴの増殖に関する研究—XXIII スモルト型アマゴの出現率の異なる2つの系統について. 岐阜水試研報 1983; **28**: 9-16.
- 22) 一柳哲也, 松田宏典, 桑田知宜. アマゴの育種に関する研究—VI 早熟雄が相分化に及ぼす影響について. 岐阜水試研報 2000; **45**: 7-12.
- 23) ALM, G. Connection between maturity, size, and age in fishes. *Inst. Freshw. Res. Rep.* 1959; **40**: 4-145.
- 24) 宇藤 均. サクラマス *Oncorhynchus keta* (Brevoort) の降海型と河川残留型の分化機構に関する研究 I. 早熟な河川残留型の体生長と性成熟. 北海道大学水産学部彙報 1976; **26**: 321-326.
- 25) 宇藤 均. サクラマス *Oncorhynchus keta* (Brevoort) の降海型と河川残留型の分化機構に関する研究 II. 早熟な河川残留型の体生長と性成熟 (その2). 北海道大学水産学部彙報 1977; **28**: 66-73.
- 26) Takami T, Aoyama T, Nagata M, Miyamoto M, Okubo S, Kawamura H. Individual growth and life-history divergence of juvenile masu salmon (*Oncorhynchus masou*) in a northern Japan stream. *Sci. Rep. Hokkaido Fish Hatchery* 1998; **52**: 21-29.
- 27) Tamate T, Maekawa K. Individual growth and phase differentiation of lacustrine masu salmon, *Oncorhynchus masou*, under artificial rearing conditions. *Ichthyol. Res.* 2002; **49**: 397-400.
- 28) 岡本信明, 尾崎照遵. DNA マーカーを利用した新しい水産育種. 「次世代の水産バイオテクノロジー」(隆島史夫編) 成山堂, 東京. 2000; 43-53.