

神戸女学院および西宮市内に生息する野生メダカ (*Oryzias latipes*) の遺伝子型分析

江口さやか^{*1}、石田紗也^{*2}、養田唯^{*2}、浦部文香^{*2}、
山本義和^{*3}、横田弘文^{*4}

Genotype Analysis of Wild Populations of Medaka (*Oryzias latipes*) in Kobe College and Nishinomiya City

EGUCHI Sayaka, ISHIDA Saya, YODA Yui, URABE Fumika,

YAMAMOTO Yoshikazu, YOKOTA Hirofumi

Abstract

Medaka (*Oryzias latipes*) is a freshwater fish found naturally in Japan, Korea and China. In Japan, the wild populations of medaka consist of three genetically different clades (A, B and C). Clade A can be subdivided into three subclades and clade B into eleven, and distribution patterns of the mitotypes in each of subclades show strong geographical associations. Recently, the release of nonnative medaka has caused increased concern about potentially detrimental effects on the genetic structure of these wild populations. To quantify the genetic impact of nonnative medaka on wild populations, we examined genetic variations within the mitochondrial cytochrome *b* gene in wild populations of medaka at three sites in Kobe College and at five sites in Nishinomiya City using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analyses. At Kobe College, almost all specimens had the B1a mitotype, a native mitotype belonging to subclade B-VII (the Setouchi subgroup) and found at various locations within Hyogo Prefecture. This finding strongly suggests that the medaka population at Kobe College originates from one of the major native groups found in Nishinomiya City. At three out of the five sites examined in Nishinomiya City, two in the Kamino-cho area and a wastewater treatment plant in Koshienhama, specimens had either the B1a or B9 mitotype, which also belongs to subclade B-VII and is found at the same locations as the B1a mitotype, suggesting that medaka populations at these sites originate from wild populations. By comparison, populations at two other sites in Nishinomiya City (Kamioichi and Naruohama) showed a high frequency of the B27 mitotype, which belongs to subclade II (the Higashinohon II subgroup) and is an original mitotype of himedaka, an orange-red type commercial strain of *O. latipes* that is widely distributed throughout Japan. The presence of the B27 mitotype in these populations implies that gene introgression from himedaka populations to wild medaka populations has occurred.

キーワード： 遺伝子型分析、メダカ、ミトコンドリア DNA、PCR-RFLP、遺伝的攪乱

Key words： Genotype analysis, *Oryzias latipes*, mtDNA, PCR-RFLP, genetic disturbance

*1 本学人間科学部環境・バイオサイエンス学科嘱託教学職員

*2 本学人間科学部環境・バイオサイエンス学科卒業生

*3 本学名誉教授

*4 本学人間科学部環境・バイオサイエンス学科准教授

連絡先：横田弘文 〒662-8505 西宮市岡田山4-1 神戸女学院大学人間科学部環境・バイオサイエンス学科
h-yokota@mail.kobe-c.ac.jp

江口さやか 〒662-8505 西宮市岡田山4-1 神戸女学院大学人間科学部環境・バイオサイエンス学科
s-eguchi@mail.kobe-c.ac.jp

1. 研究の背景と目的

メダカ (*Oryzias latipes*) は日本、韓国および中国等に広く分布している小型淡水魚である。しかしながら、国内では生息環境の悪化や生息場所の減少、近縁外来種との競合などに伴いその生息数は年々減少し、現在では環境省レッドデータブックにおいて絶滅危惧Ⅱ類に分類されている¹⁾。

国内に生息するメダカは地域ごとに異なる形態的、遺伝的特性を有することが報告されている。江上ら (1958)²⁾ は、生息地域によって尻鰭軟条数に違いがあることを報告している。Sakaizumi ら (1983)³⁾ は、アロザイム分析から国内の野生メダカを「北日本集団」と「南日本集団」の大きく二つのグループに分類し、更に南日本集団を「東日本型」、「東瀬戸内型」、「西瀬戸内型」、「山陰型」、「北部九州型」、「大隅型」、「有明型」、「薩摩型」および「琉球型」の9つの地域型に分類している。また、ミトコンドリア DNA (mtDNA) のチトクローム b 領域を用いた分析結果によると、国内の野生メダカは北日本集団 (クレード A)、南日本集団 (クレード B)、関東固有集団 (クレード C) の三つに分類され、北日本集団は更に A-I から A-III の3つのサブクレード、南日本集団は B-I から B-XI の11のサブクレードに分かれるとされている⁴⁾。この mtDNA を用いたメダカ野生集団の遺伝子型分析は、近年日本各地で行われている⁵⁻⁸⁾。

日本魚類学会では「生物多様性の保全をめざした魚類の放流ガイドライン」を策定し、遺伝的分化を遂げつつある進化的単位としての地域集団を保護する必要性を訴えている⁹⁾。しかしながら上述のように、メダカが地域ごとに独自の遺伝的特性を持った集団を形成していることは一般的にはあまり知られていない。そのため、環境保全活動や教育の一環として行われるメダカの放流により、知らず知らずのうちに異なる地域集団のメダカが放流されることが問題視されている。また、メダカはペットとしての人気が高く、養殖が盛んな地域のメダカ、あるいは野生メダカ (クロメダカ) の突然変異種であるヒメダカやシロメダカなど様々な系統が流通しており、その一部が環境中に流出することも懸念されている。このように、国内の様々な生息地域で独自の適応を遂げた在来集団同士が、人間活動によって本来の生息域を越えて混在させられ、遺伝的攪乱を引き起こす状況は、近年「国内外来種問題」として注目されている¹⁰⁾。

兵庫県西宮市では1988年、市内および近郊の河川に生息していたメダカを市職員が捕獲し、長年継代飼育してきた。2006年、メダカを飼育していた市施設の移転に伴い、メダカの一部を本学が引き取ることとなり、以降著者らの研究室が保護、育成を行ってきた。現在、「万葉池」、「大学中庭噴水池」および「中高部のピオトープ池」の3ヶ所で飼育している¹¹⁾ (図1)。

このように西宮市および本学では、1988年に市内およびその近郊で捕獲されたメダカを、市内に生息する野生集団として保護、育成してきたが、これまで同集団について遺伝子型の分析は行われていない。そのため本研究では、現在学内3ヶ所に生息しているメダカの遺伝子型を分析し、西宮在来の集団であるか否か確認した。また同時に、現在西宮市内の水路に生息し

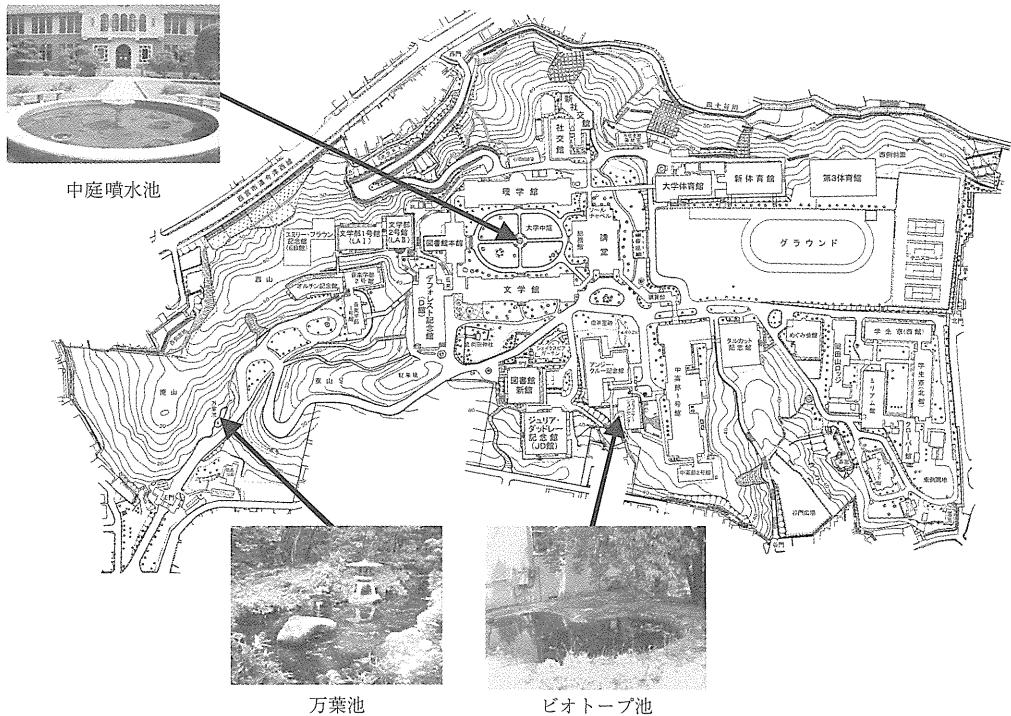


図1 神戸女学院内におけるメダカの保護、育成場所

ているメダカについても遺伝子型の分析を行い、市内に生息するメダカ集団の遺伝子攪乱の状況についても調査した。

2. 方法

2.1 メダカの捕獲場所および捕獲数

2010年8月に、本学の万葉池で10尾、中庭噴水池で10尾、そしてビオトープ池で10尾のメダカを捕獲した(図1)。西宮市内では2010年9月と10月に、上中市(図2のA)で2尾(内1尾はヒメダカ)、上之町の2ヶ所(図2のBおよびC)から8尾と10尾、鳴尾浜(図2のD)で5尾、そして甲子園浜浄化センター(図2のE)で10尾と、計5地点から合計35尾のメダカを捕獲した。捕獲したメダカは川の水を入れた容器に収容し、できるだけ速やかに著者らの研究室に持ち帰った。市内に生息する野生メダカの捕獲は、市内の河川や水路を長年維持管理し、メダカの保護、育成活動の中心的役割を担っている西宮市職員、阪本義樹氏の協力のもと行った。メダカは西宮市内でも生息場所を減らしており、現在市内で野生集団が確認されている場所は上記の4地点(上中市、上之町の2ヶ所、鳴尾浜)のみで、その生息尾数も年々減少傾向にあるとされている(阪本、私信)。そのため、各地点において少なくとも10尾の捕獲を試みたが、上記の尾数しか捕獲できなかった。一方、甲子園浜浄化センターに生息するメダカは、1988年から市内施設で飼育していたメダカを2008年以前に同センターに放流したものと、本学内で飼育していたメダカを2008年に放流したものが由来となっている。

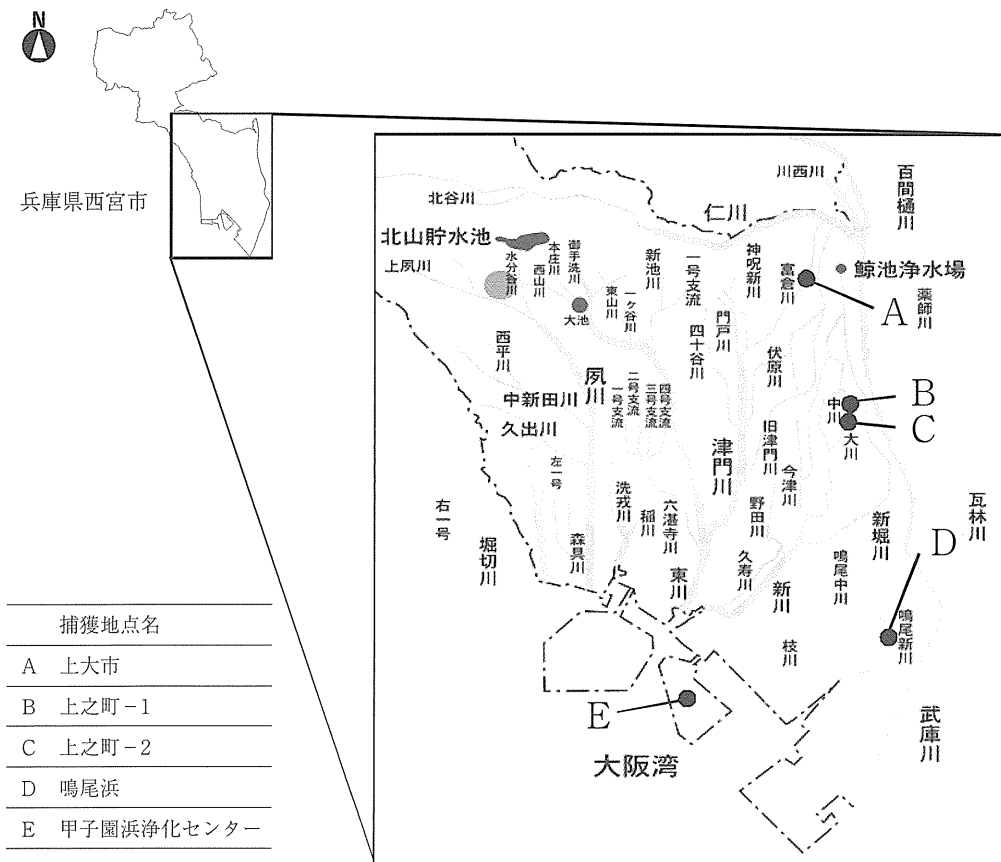


図2 西宮市南部の河川・水路と本研究におけるメダカの捕獲地点との関係

水路図は西宮市職員阪本氏より提供を受けた。

2.2 メダカ尾ひれからの遺伝子抽出

研究室に持ち帰ったメダカは直ちに氷冷麻酔をした後、尾ひれを切断してエタノールに入れ、DNA抽出時まで -20°C で保存した。尾ひれからのDNA抽出はDNeasy Blood and Tissue Kit (キアゲン)を用いた。DNA抽出手順はKitのプロトコールに従った。

2.3 PCR-RFLP法による遺伝子型分析

PCR (polymerase chain reaction) 法によりチトクロームb遺伝子 (cytb) 断片を増幅させ、増幅したcytb遺伝子断片の多型をRFLP (restriction fragment length polymorphism) 法により分析した。分析はTakehanaら(2003)⁴⁾の方法を一部改変して実施した。

2.3.1 cytb遺伝子の増幅

2.2で抽出したDNAを鋳型として、cytb遺伝子断片の増幅をPCR法により行った。プライマーはCytb Fa (5'-AGG ACC TGT GGC TTG AAA AAC CAC-3')とCytb Rva (5'-TYC GAC YYC CGR WTT ACA AGA CCG-3')を用いた⁴⁾。PCR反応液は、dNTP $4\mu\text{l}$ (0.2mM)、DNA合成酵素ExTaq (タカラバイオ) $1\mu\text{l}$ (5U)、 $10\times$ ExTaqバッファー $5\mu\text{l}$ 、

プライマー各 $5\mu\text{l}$ ($0.25\mu\text{M}$ each)、ミリ Q 水 $25\mu\text{l}$ 、DNA 溶液 $5\mu\text{l}$ を混合して $50\mu\text{l}$ とした。なお、1 尾当たり $50\mu\text{l}$ の PCR 反応液を 2 本調製した。調製した反応液は 94°C で 2 分間の熱変性を行った後、 94°C で 1.5 分、 55°C で 2 分、 72°C で 2 分の反応を 30 サイクル行った。PCR 増幅産物は 2 本分をプールして MiniElute PCR Purification Kit (キアゲン) を用いて精製した。手順は Kit のプロトコールに従った。

2.3.2 RFLP 法による *cytb* 遺伝子の多型分析

2.3.1 で増幅させ、精製した DNA 断片を 5 種類の制限酵素 (*Hae* III、*Mbo* I、*Msp* I、*Rsa* I、*Taq* I、いずれもタカラバイオ) で切断した。酵素反応は製造元の奨励条件で実施した。それぞれの制限酵素によって切断された DNA 断片は、0.01% のエチジウムブロマイド (ナカライテスク) を含む 3% アガロースゲル (ニッポンジーン) を用いた電気泳動により分離し、UV 光の下で写真撮影した。*Taq* I 酵素による切断片の電気泳動には、3% NuSieve 3:1 アガロースゲル (タカラバイオ) を用いた。5 種類の制限酵素による切断片のパターンを Takehana ら (2003)⁴⁾ によって報告されているパターン (表 1) に照合させ、マイトタイプを決定した (表 2)。

3. 結果および考察

3.1 本学に生息するメダカの遺伝子型

本学内の 3 地点で捕獲したメダカから検出されたマイトタイプを表 3 に示した。万葉池では 10 尾中 9 尾がサブクレード B-VII (瀬戸内亜群) に属する B1a (図 3A)、1 尾が既報のパターン⁴⁾ のいずれにも該当しない不明型 X1 (図 3B) であった。中庭噴水池では 10 尾中 10 尾が B1a、ピオトープ池でも 10 尾中 10 尾が B1a であった。この結果から、2006 年に本学内に放流されたメダカにはマイトタイプ B1a 集団が含まれており、現在、学内に生息するメダカの優占集団であることが明らかとなった。マイトタイプ B1a はサブクレード B-VII (瀬戸内亜群) に属すること、また、既報の研究⁴⁾ で兵庫県の姫路や淡路島に生息するメダカの中にも B1a が見出されていることから、本学内で飼育してきたメダカは、本来西宮市内に生息している主要在来集団の一つであると考えられる。このことは本学がこれまで西宮市から譲渡されたメダカの保護、育成の役割を果たしてきたことを改めて示すと共に、今後も引き続きその役割を担っていく必要性を再認識させるものである。なお、万葉池で見つかったマイトタイプ X1 個体については B1a の突然変異体の可能性も推察されるが、現時点では明らかでない。高山ら (2006)⁵⁾ は山形県内の野生メダカの遺伝子型を分析し、2 種の新規マイトタイプを報告している。そして、これら新規マイトタイプについて *cytb* 遺伝子の塩基配列に基づくクラスター解析を行い、他県に見られない山形県固有の集団である可能性を指摘している。従って、本研究で見出された X1 個体についても *cytb* 遺伝子の塩基配列を分析し、B1a との近縁関係を明らかにすると共に、このような個体が継続的にみられるのかどうか、今後も引き続き調査が必要である。

表1 神戸女学院および西宮市内に生息するメダカに見出されたチトクローム b 遺伝子の断片化パターン

制限酵素	<i>Hae</i> III			<i>Mbo</i> I		<i>Msp</i> I		<i>Rsa</i> I		<i>Taq</i> I
	J	N	P	F	I	E	G	E		a
断片のサイズ (bp) ^{※2}	563	563	563	531	531	542	473	574	592	895
	284	284	486	362	348	389	416	356	356	237
	202	202	139	348	182	259	259	293	293	61
	139	120	53		180	27	69	18		44
	53	53				13	13			4
		19			11	11				

※1 断片化パターンの名称 (アルファベット) は、Takehana ら (2003)⁴⁾ の表記に従った。

※2 それぞれの制限酵素処理によって得られる断片化パターンは他にも多数存在するが、本研究で捕獲したメダカから見出されたパターンのみを示した。

表2 神戸女学院および西宮市内に生息するメダカに確認されたマイトタイプと断片化パターン

マイトタイプ ^{※1}	制限酵素				
	<i>Hae</i> III	<i>Mbo</i> I	<i>Msp</i> I	<i>Rsa</i> I	<i>Taq</i> I
B9	J	I	E	E	— ^{※3}
B1a	J	F	E	E	a
B27	P	F	E	E	—
X1	N	F	G	E	—
X2	J	F	E	NM ^{※2}	—

※1 マイトタイプの名称は、Takehana ら (2003)⁴⁾ の表記に従った。ただし、X1 および X2 は本研究で初めて見出されたマイトタイプを示す。

※2 NM は Takehana ら (2003)⁴⁾ が示した断片化パターンのいずれにも該当しなかった。

※3 — はマイトタイプ決定のための *Taq* による制限酵素処理が不要であることを示す。

3.2 西宮市内に生息するメダカの遺伝子型

西宮市内の5地点で捕獲したメダカから検出されたマイトタイプを表3に示した。上之町-1では8尾中2尾がサブクレード B-VII (瀬戸内亜群) に属する B1a、6尾が同サブクレードの B9 (図3C)、上之町-2では10尾のうち6尾が B1a、3尾が B9、そして1尾が既報のパターン⁴⁾ および前述の X1 のいずれにも該当しない不明型 X2 (図3D) であった。上田市では2尾中1尾が B1a、そしてヒメダカの1尾がサブクレード B-II (東日本II亜群) に属する B27 (図3E) であった。鳴尾浜では5尾すべてが B27 であった。甲子園浜浄化センターでは10尾中9尾が B1a で、1尾が B9 であった。

西宮市内の水路で捕獲されたメダカのうち、上之町の2地点に生息する集団は、2種類のマイトタイプ (B1a と B9) から構成されていたが、それらはいずれもサブクレード B-VII (瀬戸内亜群) に属するものである。そして、3.1で前述したマイトタイプ B1a と同様に、マイトタイプ B9 も兵庫県姫路での検出例がある⁴⁾ ことから、上之町の2地点に生息しているメダカは、西宮在来集団であることが示唆される。一方、上田市では捕獲された2尾のうち1尾

表3 神戸女学院および西宮市内に生息するメダカのサブクレードおよびマイトタイプ

捕獲地点		分析尾数	B-VII (瀬戸内亜群)		B-II (東日本II亜群)			
			B 1 a	B 9	B27	X1	X2	
神戸女学院	万葉池	10	9				1	
	中庭噴水池	10	10					
	ビオトープ池	10	10					
西宮市内	上大市	2	1		1			
	上之町-1	8	2	6				
	上之町-2	10	6	3				1
	鳴尾浜	5			5			
	甲子園浜浄化センター	10	9	1				

サブクレードおよびマイトタイプの名称は、X1 および X2 以外、Takehana ら (2003)⁴⁾ の表記に従った。

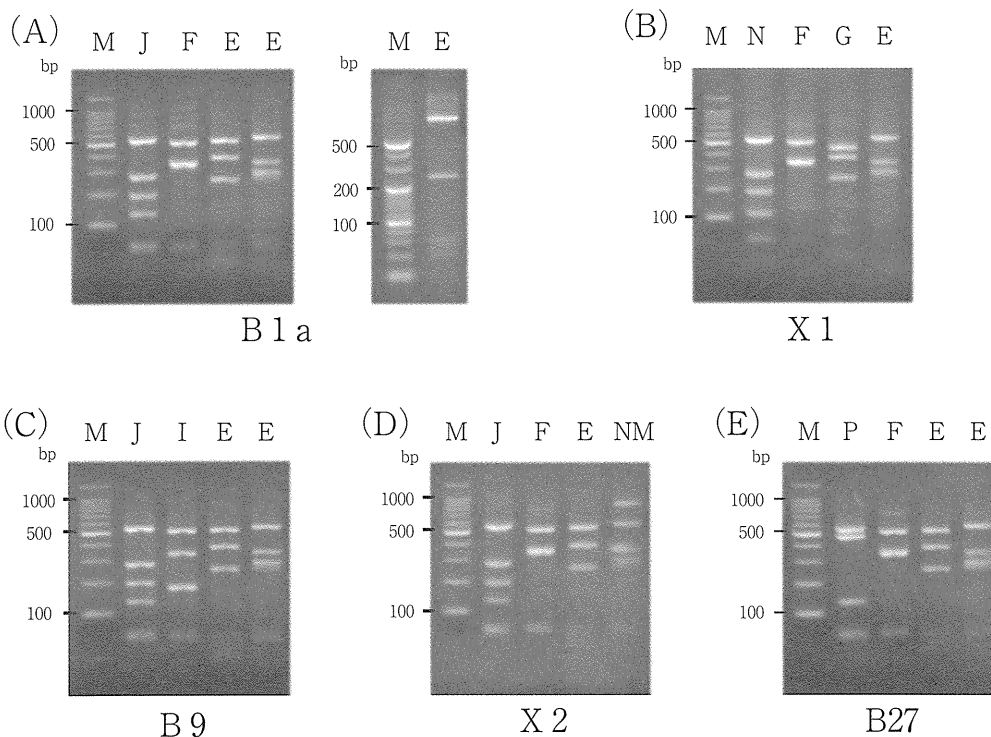


図3 神戸女学院および西宮市内メダカに見出された DNA 断片化パターンの電気泳動像

断片化パターンの名称 (アルファベット) は、Takehana ら (2003)⁴⁾ の表記に従った。ただし、NM は Takehana ら (2003)⁴⁾ の断片化パターンのいずれにも該当しなかったものを示す。M は分子量マーカーを示す。

(ヒメダカ)、そして鳴尾浜では5尾全てが、サブクレード B-II (東日本II亜群) に属するマイトタイプ B27であった。サブクレード B-II (東日本II亜群) は東北地方から紀伊半島東部まで東日本一帯に生息している集団である⁴⁾。小山ら (2009)^{7,8)} は、国内のヒメダカについて

養殖場や販売業者への聞き取り調査を行うと共に、本報と同じく mtDNA による遺伝子型分析を行っている。まず、聞き取り調査の結果として、ヒメダカの起源は愛知県弥富市もしくは奈良県大和郡山市のメダカで、種苗を健全に維持するために、かつて岡山県旭川水系のメダカをかけ合わせたことがあること、全国で流通しているヒメダカは共通の種苗であることを報告している。次に、遺伝子型分析の結果として、聞き取り調査の結果を裏付けるように、ヒメダカの約80%がサブクレード B-II（東日本II亜群）に属するマイトタイプ B27、約20%がサブクレード B-VII（瀬戸内亜群）に属するマイトタイプ B1aであることを報告している。今回著者が上大市で捕獲したヒメダカはマイトタイプ B27であり、既報の結果^{7,8)}と一致する。同地点で捕獲した他方のメダカの遺伝子型が西宮在来集団の B1aであることを考えると、ヒメダカと在来集団との交配による遺伝的攪乱^{7,8)}が生じている可能性が示唆される。また、鳴尾浜で発見されたマイトタイプ B27のメダカは、いずれもヒメダカではなく、いわゆるクロメダカであった。前述の西宮市阪本職員らの調査によると、鳴尾浜ではメダカの生息が確認された年とされなかった年とがあった（阪本、私信）。したがって、この集団は元来メダカが生息していなかった水路に他地域からのメダカが繰り返し移入された可能性、あるいは、ペットなどとして広く流通しているヒメダカ、もしくは他地域集団のメダカが移入され、在来集団と交配したことにより産まれた遺伝的攪乱集団である可能性が示唆される。なお、上之町で見出されたマイトタイプ X2 個体については、万葉池で発見された X1 と同様今後詳細な調査が必要である。

甲子園浜浄化センターで捕獲したメダカは、ほとんどが本学に生息するメダカと同じ B1a であったが、10尾のうち1尾のみマイトタイプ B9 のメダカであった。2.1で述べたとおり、同センター内のメダカは全て1988年に西宮市内およびその近郊で捕獲されたメダカ由来であることから、市施設で長年保護、育成されてきた集団の中には、B1a と B9 の少なくとも2種類のマイトタイプが存在することが明らかとなった。同じ保護集団であるにもかかわらず、本学内の集団と甲子園浜浄化センター内の集団との間で、見出されたマイトタイプの種類が異なる点については、それぞれの場所に放流された段階で組成が異なっていたのか、あるいは、本学での飼育過程においてマイトタイプ B9 の集団が淘汰されたのか、原因は明らかでない。今後、市施設で飼育されているメダカについてもその遺伝子型分析を行い、市内の保護集団について、現時点での遺伝子型の詳細を明らかにしておく必要がある。

現在、西宮市内で野生メダカの生息が確認されている場所はごくわずかであり、場所によっては生息数自体も極めて少なくなっている。本研究により、その貴重なメダカに遺伝子の攪乱が生じている可能性が示唆された。本来の生息地に生息している在来集団は、長い時間をかけてその地域の環境に適応しており、集団によっては形態的変異まで認められるとの報告もある^{2,12)}。各集団間には生殖的隔離がなく、人為的に異なる集団が持ち込まれて遺伝子攪乱が起きると、2度と元に戻すことはできない¹³⁾。人の手を介した短期間の遺伝子攪乱は、地域環境への適応力を損なわせ、メダカを生息の危機に追い込んでしまう可能性がある。

西宮市内で減少しているメダカを保護するためには、野生での生息域を拡大できるよう、生息環境を保全することが重要であると共に、本研究で明らかになったように、各地域に適応し

たメダカの集団の遺伝子を人為的に短期的に攪乱しないことが必要である。それでもなお、市内に生息するメダカの減少が続き、絶滅もしくはそれに近い状態に陥った場合には、西宮市の施設および本学で保護、育成しているメダカを放流することも選択肢の一つである。ただし、放流に際しては慎重な検討が必要である⁹⁾。本研究により、本学内での保護集団は、本来西宮市に生息している在来集団の一つであることは確認された。しかしながら表3に示すように、保護集団のミトタイプ組成は、現在西宮市内の水域に生息する集団の組成と異なっている。また、1988年に市内および近郊の河川より捕獲し、それ以降限られた集団内で世代交代を続けてきたことから、自然に生息する集団と比べて遺伝的多様性が損なわれている可能性が考えられる。更に、自然から隔離して飼育してきた期間が長いことにより、自然環境への適応力が弱まっている可能性も考えられる。保護、育成されてきた集団の安易な放流は、わずかに残った野生集団の遺伝的多様性を損ない、絶滅を却って速めてしまうことに繋がる可能性も否定できない。これらの課題は今後検討し、明らかにしていく必要がある。

4. まとめ

神戸女学院および西宮市内に生息するメダカについて mtDNA を用いた遺伝子型の分析を行った。その結果、学内3ヶ所に生息しているメダカから検出されたミトタイプのほとんどが、兵庫県下各地で生息が確認されているサブクレード B-VII (瀬戸内亜群) に属する B1a であったことから、神戸女学院内で保護、育成してきたメダカは本来西宮市内に生息している主在来集団の一つであることが強く示唆された。

西宮市内の水路に生息する野生のメダカに関しては、捕獲した5ヶ所のうち3ヶ所(上之町の2ヶ所および甲子園浜浄化センター)からは B1a と、B9 (B1a と同じサブクレードに属し、兵庫県下での生息も確認されている) の2型のみ検出され、この3ヶ所の野生メダカは西宮在来集団である可能性が高いといえる。一方、他の2ヶ所(上大市および鳴尾浜)からは、サブクレード B-II (東日本II 亜群) に属するミトタイプ B27 のメダカが見出された。従ってこの2ヶ所では、在来集団と、ヒメダカもしくは他地域からの移入集団との交配による遺伝的攪乱が生じている可能性が示唆された。

謝辞

本研究では、西宮市環境局 環境学習推進グループの阪本義樹氏をはじめとする多くの職員の方々にご協力いただきました。心からお礼申し上げます。また本稿の執筆にあたり、新潟大学理学部の酒泉満教授にご助言を頂きましたので、ここに記し、お礼を申し上げます。

参考文献

- 1) 環境省自然環境局野生生物課. 改正・日本の絶滅のおそれのある野生生物—レッドデータブック— 4 汽水・淡水魚類. 2003; 162-163.
- 2) 江上信雄, 吉野道仁. メダカの臀鰭軟条数の変異に関する研究. 魚類学雑誌 1958; 3: 83-88.
- 3) Sakaizumi M, Moriwaki K, Egami N. Allozymic variation and regional differentiation in wild population of the

fish *Oryzias latipes*. Copeia. 1983; 311-318

- 4) Takehana Y, Nagai N, Matsuda M, Tsuchiya K, Sakaizumi M. Geographic Variation and Diversity of the Cytochrome b Gene in Japanese Wild Populations of Medaka, *Oryzias latipes*. Zoological Science. 2003; 20: 1279-1291.
- 5) 高山一渡辺絵理子, 辻徹, 佐藤政則, 土井寅治, 八嶽拓司, 佐々木隆行, 渡辺明彦, 鬼武一夫. 山形県内に生息する野生メダカにおける種内分化の分子遺伝学的解析. 山形大学紀要. 自然科学. 2006; 16: 55-69.
- 6) 齋田圭太, 松田勝, 水谷正一. ミトコンドリア DNA を指標とした栃木県産野生メダカの遺伝的多様性の解析. 農業農村工学会全国大会講演要旨集. 2009; 750-751.
- 7) 小山直人, 北川忠生. 大和川水系でみとめられたヒメダカによる遺伝的攪乱. 日本魚類学会主催 市民公開シンポジウム「国内外来魚問題の現状と課題」講演要旨. 2009; 7.
- 8) 小山直人, 北川忠生. 奈良県大和川水系のメダカ集団から確認されたヒメダカ由来のミトコンドリア DNA. 魚類学雑誌. 2009; 56: 153-157.
- 9) 森誠一. 生物多様性の保全をめざした魚類の放流ガイドライン. 応用生態工学. 2005; 8: 107-110.
- 10) 瀬能宏. 国内外来種とは何か?. 日本魚類学会主催市民公開シンポジウム「国内外来魚問題の現状と課題」講演要旨. 2009; 1.
- 11) 北井秀美, 大枝かをる. 神戸女学院大学での野生メダカの保護・育成に関する基礎研究. 神戸女学院大学人間科学部卒業論文. 2007.
- 12) 渡辺勝敏・高橋洋・北村晃寿・横山良太・北川忠生・武島弘彦・佐藤俊平・山本祥一郎・竹花佑介・向井貴彦・大原健一・井口恵一朗. 日本産淡水魚類の分布域形成史：系統地理的アプローチとその展望. 魚類学雑誌. 2006; 53: 1-38.
- 13) 竹花佑介. シリーズ 日本の希少魚類の現状と課題 メダカ：人為的な放流による遺伝的攪乱. 魚類学雑誌. 2010; 57: 76-79.

(原稿受理日 2012年2月28日)