

染色体と赤血球によるヤマメの倍数性の判定

米沢純爾・長谷川敦子・吉野典子*

養殖魚における有用品種の開発を目的に三倍体魚の作出が行われているが、これに伴い養殖の現場において倍数化の判定を確実かつ効率的に行う必要が生じている。倍数性は一般に体細胞の染色体数により判別され、そのためのいくつかの手法が考案されている¹⁻⁶⁾。そこで、本実験ではヤマメを材料として各手法による染色体標本の作成を行い、養殖現場における実用性を比較検討した。また近年、赤血球径による倍数性の判定が行われているが^{7,8)}、その実用性についても検討した。

材料と方法

供試魚 1985年11月に東京都水産試験場奥多摩分場産ヤマメから採取した卵と精子を用い、高温処理による三倍体魚の作出実験を行った。この実験によって作出した発眼卵および稚魚を供試魚とした。

染色体標本の作成法 発眼卵の胚体を材料として eyed-embryo direct method¹⁾により、染色体標本を作製した。また10g未満の稚魚より腎臓細胞を摘出し chopping method²⁾, flame-drying method³⁾, air-drying method⁴⁾, 腎臓培養法⁵⁾の各方法により、染色体標本を作製した。鰭培養法⁶⁾では一定量以上の鰭が必要

となるため、10g以上の稚魚より鰭を採取し染色体標本を作製した。1検体につき3枚以上のプレパラートを作製し顕微鏡で観察するとともに、中期分裂像を撮影して染色体数から倍数性を確認した。また、以上の各手法ごとに倍数性判定率（染色体数確認検体数/供試検体数×100）を算出した。

赤血球塗末標本の作製 上記の鰭培養法で倍数性を確認した三倍体と二倍体各10尾を実験に供した。供試魚の被鱗体長は三倍体が94～175mm、二倍体は98～158mmであった。キュービエ氏管より採血して塗末標本を作製し、顕微鏡に装着したマイクロメーターを用いて赤血球の長径と短径を測定した。1尾につき100個の赤血球を計測し、その平均値を各検体の赤血球径とした。

結 果

染色体による倍数性の判定 倍数性判定率を表1に、各手法で作成した染色体の中期分裂像を図1に示した。倍数性判定率が最も高かったのは鰭培養法の66.7%で、続いて chopping method の24.1%、以下、eyed-embryo direct method, air-drying method, flame-drying method の順で、腎臓培養法では中期分裂像が

表1 染色体標本作成法と倍数性判定率

染色体標本作成法	検体サイズ	検体数	倍数性確認検体数	倍数性判定率(%)
eyed-embryo direct method	発眼胚	95	11	11.6
chopping method	0.1～0.5g	330	89	27.0
〃	0.5～1.0g	256	53	20.7
〃	1～5g	25	5	20.0
flame-drying method	0.1～0.5g	24	2	8.3
air-drying method	1～10g	101	11	10.9
腎臓培養法	1～10g	14	0	0.0
鰭培養法	10g以上	30	20	66.7

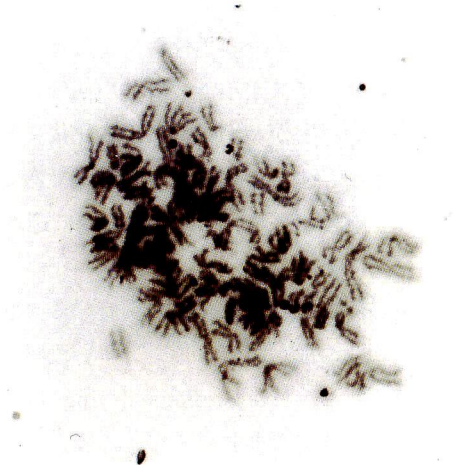
* 日本大学農獣医学部



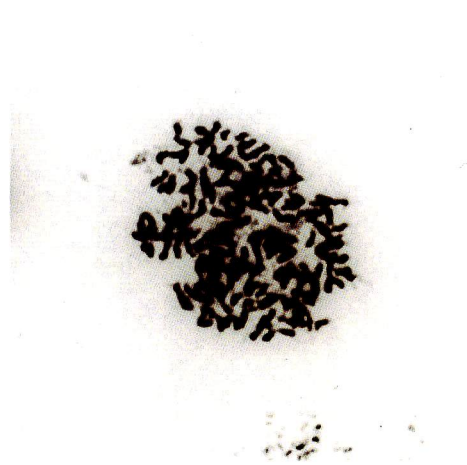
eyed-embryo direct method (2n)



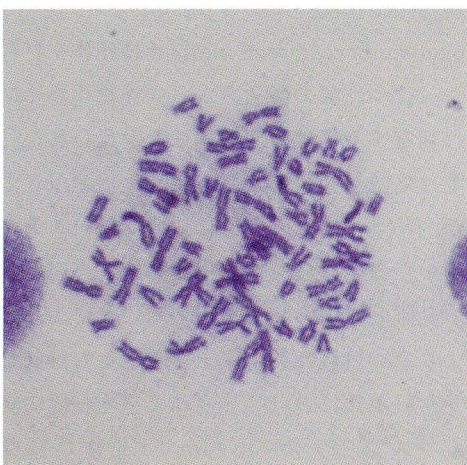
chopping method (3n)



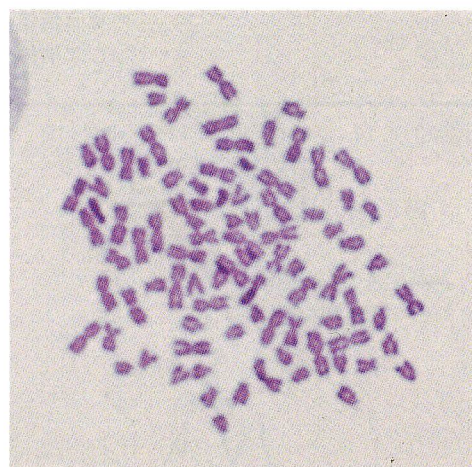
flame-drying method (2n)



air-drying method (2n)



鱈培養法 (2n)



鱈培養法 (3n)

図1 各種方法で作成したヤマメの染色体中期分裂像

得られなかった。chopping method による倍数性判定率は供試魚が 0.5g 以下のサイズで高く、供試魚が大きくなるに従い低下する傾向がみられた。

赤血球径による倍数性の判定 赤血球径の測定結果を表 2 および図 2 に示した。長径の平均値は三倍体が 17.6 μm に対し、二倍体は同 14.6 μm で、両者の比は 1.21 であった。短径の平均値は三倍体が 10.7 μm に対し、二倍体が 9.4 μm で、両者の比は 1.14 であった。平均値では長径、短径とも三倍体が有意に高い値を示したが ($p < 0.01$)、個々の検体についてみると二倍体の一部は長径、短径とも三倍体の値を上回っている。図 3 に示すように、赤血球の長径が三倍体の中で最小値を示した検体と、二倍体の中で最大値を示した検体に

表 2 赤血球径の測定結果

区 分	長 径 (μm)		短 径 (μm)	
	三倍体	二倍体	三倍体	二倍体
最小	15.7	13.1	9.6	7.9
最大	19.2	16.0	11.7	10.3
平均値	17.6	14.6	10.7	9.4
標準偏差	1.21	0.95	0.59	0.68

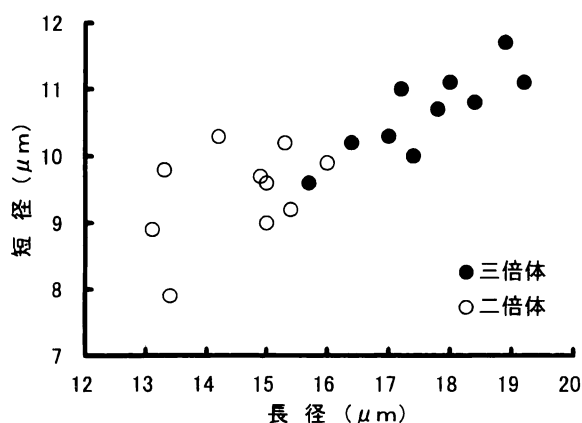


図 2 赤血球の長径と短径の関係

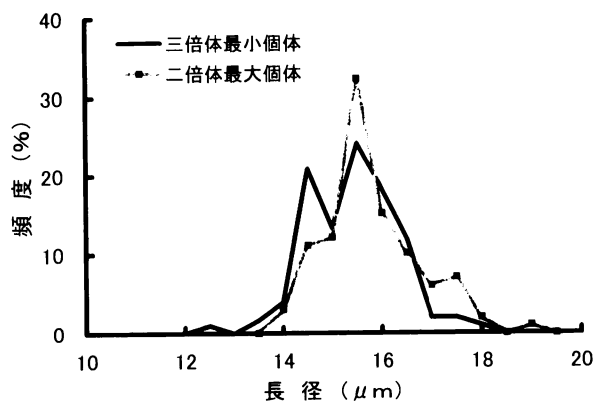


図 3 Price-Jones 曲線

ついて Price-Jones 曲線を描くと、ほぼ一致した。

考 察

今回用いた 6 種類の染色体標本作製法の中では、鰭培養法を用いた場合に倍数性判定率が高く、得られた染色体の中期分裂像も鮮明であった。しかし、この手法は細胞培養に関する技術と設備を必要とするうえ、魚が 10g 程度の大きさに成長しないと、検体として使用できないなど制約も多い。従って、倍数性の判定手法としては、成長した魚を殺さずに判定したいというような特殊な場合には効果的であるが、養殖現場における倍数性の判定法としての実用性は低いと考える。

chopping method は簡易な設備で染色体標本を作成できるうえ、倍数性判定率も比較的高いことから、養殖現場において十分実用性があると考えられる。今回の実験から魚体サイズが小さいほど中期分裂像の得られる頻度が高いことがわかったが、ふ化後まもない個体では腎臓が小さすぎて取り扱いが困難である。このため本法は、体重 0.2~0.4g 前後の魚体に適用するのが現実的である。

養殖現場では作出魚を無駄に飼育するのを避けるため、三倍体化の成功をできるだけ早い段階で確認することが望まれる。しかし、flame-drying method と air-drying method では器具付着による臓器の損失が大きいため、小さな魚体で染色体標本を作成するには不向きと考えられる。従って、三倍体化早期判定手法としての実用性は低いであろう。

eyed-embryo direct method は胚体を材料とすることや、標本作製の簡便さから、養殖現場で倍数性を早期に判定するには最適の手法と考えられた。今回の実験では倍数性判定率が chopping method より低かったが、Ueda¹⁾はこの方法について早いステージの胚体を用いた場合に分裂像の出現頻度が高いと報告している。発眼期以前の胚体を用いることにより、今回の実験より高い倍数性判定率を得ることも可能であろう。

サケ科魚類における赤血球の平均長径に関しては、ニジマスで三倍体が 18.2 μm 、二倍体で 15.6 μm 、両者比 1.17⁷⁾、アマゴで三倍体が 19.8 μm 、二倍体で 15.8 μm 、両者比 1.25⁸⁾等の報告がある。これらに比較して、今回のヤマメの赤血球長径の測定値はやや小さいものの、三倍体と二倍体の測定値比はほぼ同様であった。また今回は、ヤマメの赤血球径の分布が二倍体と三倍体で

連続する結果となったが，このような分布の連続性はニジマスでも指摘されている⁷⁾。血液塗末標本の作成は，染色体標本の作製に比べ著しく簡便であるが，上述のように，倍数性の判定にあたっては正確性に欠ける。また，ふ化後もない稚魚では採血が困難なため，本法では倍数性の早期判定は困難である。

文 献

- 1) Ueda, T. (1986) Preliminary examination of obtaining chromosome preparation for fish breeding. *Bull. Fac. Educ. Utsunomiya Univ.* (36) : 81-85.
- 2) Yamazaki, F., H. Onozato, and K. Arai (1981) The chopping method for obtaining permanent chromosome preparation from embryos of teleost fishes, *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 47 (7) : 963.
- 3) Murofushi, M. and H. T. Yosida (1979) Cytogenetical studies on fishes, I, Karyotypes of four file-fishes. *Japan. J. Genet.*, 54 : 191-195.
- 4) 小島吉雄 (1983) 魚類細胞遺伝学. 水交社, 東京 : 453p.
- 5) Yamamoto, K. and Y. Ojima (1973) A PHA-culture method for cells from the renal tissue of teleosts. *Japan. J. Genet.*, 48 : 235-238.
- 6) 上田高嘉・小島吉雄 (1984) ヒメマスの性染色体. 日本水産学会誌, 50 (9) : 1495-1498.
- 7) 小島将男・岩橋正雄 (1985) 温度ショックによるニジマス染色体の倍数化効果について. 新潟内水試研報, (12) : 39-44.
- 8) 臼田博 (1986) 染色体操作による有用魚種の品質改善研究—I, 温度処理による3倍体アマゴの作出と飼育. 岐阜水試研報, (31) : 15-19.