

ヤマメにおける赤血球長径, 最大核小体数, 顕微蛍光測光による倍数性判定法の比較

城 智聡・工藤真弘

全雌三倍体ヤマメの実用化に際しては, 倍数化処理魚群の倍数性を迅速かつ正確に判定しなければならない。倍数性の判定手法としては, これまでに染色体数の計数¹⁾, 赤血球長径の測定¹⁻³⁾, 最大核小体数の計数⁴⁾, 顕微蛍光測光⁵⁾, フローサイトメトリー⁶⁾等が報告されている。そこで著者らは, これらのうち赤血球長径の測定, 最大核小体数の計数, 顕微蛍光測光の三手法を用いて, それぞれの判定精度について比較検討した。また, 作業性, 簡便性等, 東京都水産試験場奥多摩分場で全雌三倍体ヤマメを作出する際の最適な倍数性判定手法について検討したので報告する。

材料と方法

実験 1 手法別倍数性判定精度の検討

供試魚 東京都水産試験場奥多摩分場産ヤマメ 1⁺年魚から採卵し, 性転換雄精子を媒精した後, 温度による倍数化処理⁷⁾を施した倍数化処理区 12尾と, 通常雄精子で媒精し, 倍数化処理を行わない無処理区 12尾の計 24尾を用いた。供試魚はともに浮上直後の稚魚で, 平均体重は倍数化処理区が 0.15g, 無処理区が 0.16g であった。

染色体数の計数 あらかじめ染色体数を確認するための染色体の計数は直接法によった⁸⁾。すなわち, 供試魚から摘出した鰓を 0.02% コルヒチン MEM-10 に 30分以上, さらにトリブシン溶液に 10分間浸漬した後, 0.075M 塩化カリウム溶液中で 30~60分間の低張処理を施し, カルノア液 (CH₃COOH:CH₃OH=1:3) で固定した。さらにこの固定標本をスライドグラス上にスタンプし, 火炎固定後, ギムザ染色を施して検鏡した。

赤血球長径の測定 供試魚の尾柄部を切断して流出した血液を直接スライドグラスに塗布し, 風乾後ギムザ染色を施し, ミクロメーターを用いて赤血球の長径を計測した。

最大核小体数の計数 供試魚の尾鰭の一部を切断し

てカルノア液で固定したものにスライドグラス上で 50% 酢酸を加え, メスで細片化して均一に広げた。風乾後, 銀染色⁴⁾を施し, 50℃ に保ったホットプレート上で 5~6分間加温した。茶褐色に変色した標本を検鏡して, 核小体数を計数した。

顕微蛍光測光 カルノア液で固定した供試魚の鰓をスライドグラスの右半分, 対照として同様に固定した通常二倍体魚の鰓(2n)を左半分にスタンプした。風乾後 DAPI(4',6-diamidino-2phenylindolehydrochloride) 染色液中に 60分間浸漬し, 再度風乾させた。その後, 同染色液を数滴滴下し, カバーグラスをかけてエナメルで封入した標本について, 顕微蛍光測光装置 OSP-1 (オリンパス社製) 下で蛍光量を測定した。

実験 2 倍数化率を推定するための最適手法の検討

供試魚 0⁺年魚 (浮上直後) は実験 1 と同一の倍数化処理区 12尾 (平均体重 0.15g), 無処理区 12尾 (平均体重 0.16g) の合計 24尾とし, 1⁺年魚は無処理区 5尾 (平均体重 60.9g), 倍数化処理区 5尾 (平均体重 79.0g) の合計 10尾, 2⁺年魚は倍数化処理区 6尾 (平均体重 201.2g) とした。顕微蛍光測光については 0⁺年魚の無処理区, 倍数化処理区とも判定尾数を 10尾とし, 対照には鰓の他に通常魚の精子 (n) を用いた。倍数化処理区の処理条件は実験 1 と同様とした。

倍数性の判定手法 赤血球長径の測定のうち 1⁺, 2⁺年魚については尾柄部を切断して流出した血液をカバーグラスに少量採り, スライドグラス上に均一に広げてギムザ染色を施した。その他の手法については実験 1 と同様に行った。

結 果

実験 1 染色体数の計数によって三倍体 (以下 3n) であることが確認できたものは倍数化処理区の 3個体, 二倍体 (以下 2n) であることが確認できたものは無処理区の 3個体であった。倍数性が確認された個

体の赤血球長径の度数分布を図1に示した。測定値の分布範囲は広く重複しており、平均長径は2nが14.9~15.7 μm 、3nが18.3~19.0 μm で、分散分析の結果、2nの3個体間、3nの3個体間ではともに有意差はみられず、2n個体と3n個体の間には、いずれの組み合わせにおいても有意差が認められた。

倍数性が確認された個体の最大核小体数を表1に示した。2nは2個、3nは3個となり、ニジマスと同様に核小体を3個持つ細胞が出現した個体を3nと判断で

表1 倍数性確認個体の核小体数 (ヤマメ0+年魚)

個体	観察細胞数	核小体数出現率 (%)		
		1*	2*	3*
2n-4	50	64 (32)	36 (18)	— (0)
	50	56 (28)	44 (22)	— (0)
2n-7	50	56 (28)	44 (22)	— (0)
	50	52 (26)	48 (24)	— (0)
2n-8	50	66 (33)	34 (17)	— (0)
	50	64 (32)	36 (18)	— (0)
3n-14	50	16 (8)	52 (26)	32 (16)
	50	10 (5)	62 (31)	28 (14)
3n-17	50	32 (16)	58 (64)	10 (5)
	50	36 (18)	64 (32)	— (0)
3n-20	50	28 (14)	70 (35)	2 (1)
	50	30 (15)	68 (34)	2 (1)

*1細胞当たりの核小体数 ()は細胞数

表2 赤血球長径の平均値による倍数性の判定 (ヤマメ0+年魚)

No.	平均長径 (μm)	標準偏差	判定結果	
無処理区	1	14.48	0.93	2n
	2	14.92	1.23	2n
	3	14.72	1.25	2n
	4	14.76	0.89	2n
	5	14.33	1.01	2n
	6	14.56	1.04	2n
	7	14.97	0.94	2n
	8	15.44	0.99	2n
	9	14.60	1.08	2n
	10	15.41	1.02	2n
	11	14.60	0.91	2n
	12	14.69	1.26	2n
Ave.	14.79	0.34		
無処理区	13	18.02	1.16	3n
	14	18.31	1.06	3n
	15	18.20	1.25	3n
	16	17.38	1.46	3n
	17	17.97	1.20	3n
	18	17.29	1.49	3n
	19	17.87	1.91	3n
	20	19.25	1.55	3n
	21	17.63	2.47	3n
	22	17.55	1.47	3n
	23	17.90	1.74	3n
	24	18.32	1.41	3n
Ave.	17.97	0.54		

測定数は50細胞/個体

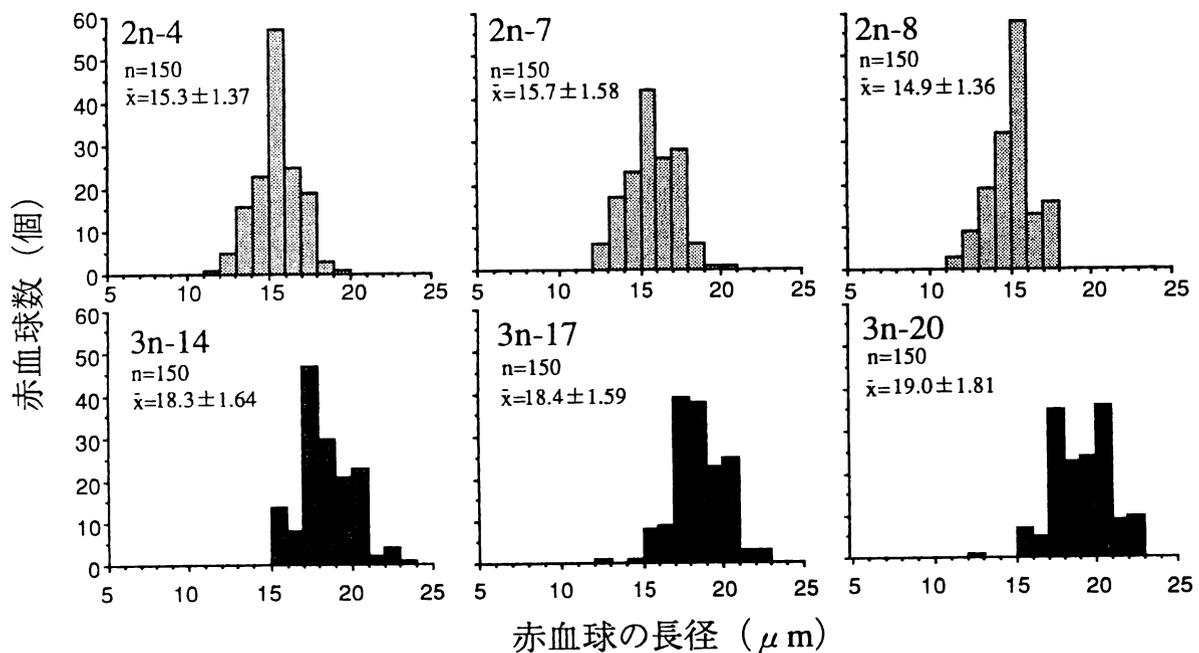


図1 倍数性確認個体の赤血球長径測定値の分布

きと考えられた。ただし、出現率には個体差がみられ、同一個体でも標本によっては核小体を3個持つ細胞が確認できないものがあった。

倍数性が確認された個体の蛍光測光値の頻度分布を図2に示した。2nに対する3nの測光値の比率は1.32 (2n-4:3n-14) ~ 1.52 (2n-7:3n-17) であった。

実験2 赤血球長径の平均値による各区の倍数性判定結果を表2, 3に示した。分散分析の結果、無処理区、倍数化処理区とも0+, 2+年魚と比較して、1+年魚の平均長径が有意に小さかった。しかし、無処理区と倍数化処理区の間には年級を問わず有意差が認められた。2nの平均長径の最大+1.96×標準偏差よりも大きいものを3nと判断すると、倍数化処理区の全個体が3nと判断され、0+, 1+, 2+とも倍数化率は100%となった。

最大核小体数による各区の倍数性判定結果を表4.5に示した。無処理区では全個体で1細胞当たりの最大核小体数が2個で、全て2nと判定された。倍数化処理区では核小体を3個持つ細胞が出現した個体を3n

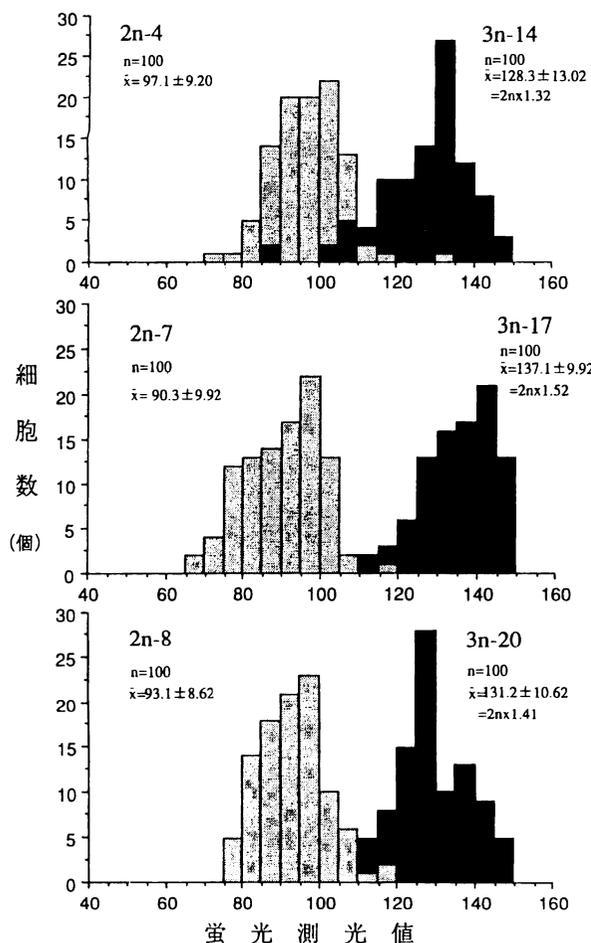


図2 倍数性確認個体の蛍光測光値の分布

表3 赤血球長径の平均値による倍数性の判定 (ヤマメ 1+, 2+年魚)

No.	平均長径(μm)	標準偏差	判定結果
1+年魚			
無処理区 1	13.77	1.14	2n
2	12.78	0.91	2n
3	12.79	0.82	2n
4	13.64	0.93	2n
5	14.28	1.07	2n
Ave.	13.45	0.65	
処理区 6	17.62	1.23	3n
7	16.41	1.20	3n
8	17.29	1.41	3n
9	16.33	1.13	3n
10	15.93	0.87	3n
Ave.	16.71	0.71	
2+年魚			
処理区 1	18.03	0.97	3n
2	18.38	1.05	3n
3	18.17	1.16	3n
4	18.82	0.91	3n
5	18.76	1.01	3n
6	18.68	0.94	3n
Ave.	18.47	0.33	

測定数は50細胞/個体

表4 最大核小体数による倍数性の判定 (ヤマメ 0+年魚)

No.	核小体出現率 (%)			判定結果
	1*	2*	3*	
無処理区 1	79	21	0	2n
2	80	20	0	2n
3	60	40	0	2n
4	60	40	0	2n
5	64	36	0	2n
6	58	42	0	2n
7	54	46	0	2n
8	65	35	0	2n
9	48	52	0	2n
10	65	35	0	2n
11	64	36	0	2n
12	60	40	0	2n
処理区 13	16	59	25	3n
14	13	57	30	3n
15	16	53	31	3n
16	13	64	23	3n
17	34	61	5	3n
18	14	59	27	3n
19	21	53	26	3n
20	29	69	2	3n
21	14	62	24	3n
22	6	63	31	3n
23	7	54	39	3n
24	7	54	39	3n

*1細胞当たりの核小体の数
測定数は50細胞/個体

表5 最大核小体数による倍数性の判定 (ヤマメ1+, 2+年魚)

	No.	核小体出現率 (%)			判定結果
		1*	2*	3*	
1+年魚					
無処理区	1	38	62	0	2n
	2	40	60	0	2n
	3	34	66	0	2n
	4	36	64	0	2n
	5	37	63	0	2n
処理区	6	13	56	31	3n
	7	8	63	29	3n
	8	14	46	40	3n
	9	6	54	40	3n
	10	12	45	43	3n
2+年魚					
処理区	1	23	53	24	3n
	2	13	59	28	3n
	3	12	61	27	3n
	4	32	68	0	2n
	5	12	65	23	3n
	6	15	48	37	3n

*1 細胞当たりの核小体の数
測定数は50細胞/個体

表6 顕微蛍光測光による倍数性の判定 (ヤマメ0+年魚)

	No.	測光値 (相対値)			比率	判定結果
		精子(n)	Cont(2n)	Sample		
無処理区	1	43.89	116.27	2.65	2n	
	2	40.37	114.00	2.82	2n	
	3	38.40	123.22	3.21	2n	
	4	47.12	97.34	2.07	2n	
	5	45.18	115.31	2.55	2n	
	平均			2.66		
	標準偏差			0.42		
	6		129.33	99.74	0.77	2n
	7		146.52	132.16	0.90	2n
	8		152.12	139.13	0.91	2n
処理区	9		150.58	125.24	0.83	2n
	10		137.98	123.01	0.89	2n
	平均			0.86		
	標準偏差			0.60		
	13	44.46	173.60	3.90	3n	
	14	49.36	185.87	3.77	3n	
	15	44.40	159.30	3.59	3n	
	16	41.85	173.64	4.15	3n	
	17	45.74	195.47	4.27	3n	
	平均			3.94		
標準偏差			0.28			
18		138.08	200.35	1.45	3n	
19		138.42	192.82	1.39	3n	
20		143.88	228.63	1.59	3n	
21		134.29	224.28	1.67	3n	
22		152.82	211.05	1.38	3n	
平均			1.50			
標準偏差			0.13			

測定値は20細胞/個体

表7 顕微蛍光測光による倍数性の判定 (ヤマメ1+, 2+年魚)

	No.	測光値 (相対値)		比率	倍数性
		Cont(2n)	Sample		
1+年魚					
無処理区	1	103.78	98.02	0.94	2n
	2	97.64	94.11	0.96	2n
	3	98.28	109.00	1.11	2n
	4	94.56	103.41	1.09	2n
	5	82.20	94.22	1.15	2n
平均				1.05	
標準偏差				0.09	
処理区	6	98.87	150.76	1.52	3n
	7	87.03	134.22	1.54	3n
	8	106.97	132.94	1.24	3n
	9	102.59	167.85	1.64	3n
	10	88.49	145.04	1.64	3n
平均				1.52	
標準偏差				0.16	
2+年魚					
処理区	1	102.44	147.93	1.44	3n
	2	99.30	147.44	1.48	3n
	3	106.28	143.92	1.35	3n
	4	116.72	194.53	1.67	3n
	5	84.71	110.49	1.30	3n
	6	88.00	133.28	1.51	3n
平均				1.46	
標準偏差				0.14	

測定値は20細胞/個体

と判断すると、0+, 1+年魚は全て3nと判定され、倍数化率は100%となった。2+年魚では1個体が2nと判定され、倍数化率は83.3%となった。

顕微蛍光測光による判定結果を表6, 7に示した。測光値の比率について無処理区(0+, 1+)と倍数化処理区(0+, 1+, 2+)の間で有意差が認められた。無処理区における比率の最大値(精子Cont=3.21, 2n Cont=1.15)+1.96×標準偏差を上回るものを3nと判断すると、倍数化処理区のすべてが3nと判断され、倍数化率は100%となった。

考 察

奥多摩分場で三倍体ヤマメの作出を行う上で最適な倍数性判定手法の選択を、判定精度と作業性について検討すると以下ようになった。

赤血球長径測定の場合、倍数性判定の精度は、ヤマメ²⁾およびアマゴ³⁾の報告にみられるように、2nと3nの長径の測定値が完全に分離していれば少数の計測で正確な判定が可能である。しかし今回は、米沢ら¹⁾の結果と同様に分布範囲が広く重複しているため、ある程度の個数を測定し、その平均値で判断しなければなら

ない。この場合、標本作成作業や長径の計測は簡便であるものの、判定に至るまでの計測数が多くなり、結果として作業の絶対量が増加してしまう。

最大核小体数では、1細胞当たり3個の核小体を持つものが観察できた時点で2nを3nと誤ることはなく、3nの判断には最も適している。しかし、1細胞当たり3個の核小体を持つ細胞が観察できない場合の判断が難しく、3nを2nと誤認して倍数化率を過小評価する可能性がある。

顕微蛍光測光では蛍光測光値が相対値であるため1標本ごとに対照と比較する必要があるが、対照の測光値と検体の測光平均値の比較によって正確な判定が可能である。また、コンピュータに連動して即時に頻度分布を確認できるため、判定の作業性は最も安定している。

標本作製の作業性は、採血が可能な個体を用いる場合、赤血球の長径が最も簡便である。本法では組織の固定などは不要で、染色にも長時間を必要とせず、全体として短時間で観察が可能である。一方、最大核小体数は組織の固定が必要であるが、あらかじめ固定した組織があれば、赤血球と同程度の時間で観察が可能になる。また、使用する組織が鱗や鰓などの一部であるため、採血ができない個体でも判定可能であり、卵についても胚を取り出して判定することができる。ただし、観察中に染色液が漏れ出すことがあり、染色液の封入等について技法の改良が必要と思われる。顕微蛍光測光は鰓以外でも判定が可能であり、最大核小体数と同様に採血できない個体についても判定可能であるが、染色や封入に時間を要し作業性では最も劣る。

このように、いずれの手法にも長所、短所があり、最適な判定手法を一つに限定することは困難であるが、2nと3nとで赤血球の長径の分布範囲が分離している場合には、数個の細胞を計測すれば判定できることから、本法が最も簡便かつ確実である。このため一般的には、採血可能であれば赤血球長径測定法を用い、採

血できない場合のみ最大核小体数および顕微蛍光測光を用いるのがよいと考えられる。しかし、前述のように奥多摩分場産ヤマメでは、2nと3nとで赤血球長径の分布範囲が重複しているため、判定作業のしやすさから最大核小体数計数の方が赤血球長径測定よりも簡便となる。したがって、奥多摩分場産ヤマメで簡便かつ、確実に倍数性を判定するためには、まず最大核小体数によって3nと判定できるものを選び出し、残りの検体について、採血可能な場合は赤血球長径を、不可能な場合は顕微蛍光測光を用い、重ねて判定を行うという方法が最も望ましいといえる。

文 献

- 1) 米沢純爾・長谷川敦子・吉野典子 (2000) 染色体と赤血球によるヤマメ倍数性の判定. 東京水試調査研報., (212) : 60-63.
- 2) 吉沢和俱・高橋麻次郎・林不二夫 (1987) 染色体操作による魚類の改良種作出研究-I. 群馬農業研究, E水産 (3) : 1-9.
- 3) 白田博 (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. 岐阜県水試研報., (31) : 15-19.
- 4) Phillips, R. B., K. D. Zajicek, P. E. Ihssen, and O. Johnson (1986) Application of silver staining to the identification of triploid fish cells. *Aquaculture*, 54 : 313-319.
- 5) 内村祐之・古丸明・和田克彦・山本博史・山本勝・古田弘文 (1987) アコヤガイ人為三倍体幼生核 DNA 量の顕微蛍光測光法による比較. 水産育種, 12 : 57-70.
- 6) Allen, S. K. JR. (1983) Flow cytometry : Assaying experimental polyploid fish and shell-fish. *Aquaculture*, 33 : 317-328.
- 7) 工藤真弘・小野淳 (2000) 全雌三倍体ヤマメ作出のための適切な高温処理条件と初期減耗. 東京水試調査研報., (212) : 26-27
- 8) Ueda, T. (1986) Preliminary examination of obtaining chromosome preparation for fish breeding. *Bull. Fac. Educ. Utsunomiya Univ.* (36) : 81-85.