

冷蔵保存したワカサギ精巣精子の 運動能と受精能の検討

井 塚 隆

Motility and Fertilizing Capacity of Chilled Testicular Spermatozoa in
Wakasagi Hypomesus nipponensis.

Takashi IZUKA*

緒 言

魚類の精子保存は冷凍と冷蔵による方法に大別される^{1,2)}。前者は凍結速度や添加保護物質などについて比較的多くの研究例があるもの^{3,4)}、凍結および保存には-79以下の低温条件が得られる設備が必要であるなど、技術的に容易な手法とはいえない。しかしながら、冷凍保存技術は優良品種の遺伝的形質の保存や、絶滅に瀕した種・系統の遺伝的保護といった、遺伝子バンクとしての機能が期待されている³⁾。

これに対して、後者の冷蔵保存は技術的・施設的な簡便さから、種苗生産の現場では人工受精作業の効率化などにおいて実用的であるとされている^{1,2)}。冷蔵保存に関する研究は冷凍保存と比較して多くはないものの、主にサケ *Oncorhynchus keta*⁵⁾、ニジマス *O. mykiss*^{1,6,7,8)}、アマゴ *O. masou ishikawae*^{1,9,10)}、アユ *Plecoglossus altivelis altivelis*¹¹⁾、クロダイ *Acanthopagrus schlegelii*¹²⁾、サワラ *Scomberomorus niphonius*¹³⁾ で断片的ながら検討されている。しかし、ニジマスにおいては保存精子の運動能だけでなく、その受精能についても調べられており、その実用性が示唆されている⁸⁾。

ワカサギ *Hypomesus nipponensis* においては、岡本他¹⁴⁾ が精巣精子の冷蔵保存時間と発眼率の関係について検討しているが、保存時間は数時間と短いうえ、精子の運動活性については触れられていない。また、井塚¹⁵⁾ は精巣精子の冷蔵保存に適した希釈液を検討し、最長で35日間の精子運動性の保存を認めているが、その受精能については言及していない。一般的に、精子の運動能と受精能は相関すると考えられるが¹⁶⁾、黒倉³⁾ は両者の関係はまだ十分に検討されておらず、運動精子の割合だけで受精率を決定するのは危険であるとしている。

そこで、本研究ではワカサギの冷蔵保存した精巣精子の運動能とともに受精能についても、その経時的変化を明らかにし、本種の人工受精における保存精子の実用性を検討することとした。

材料および方法

希釈液の調製

精子保存のための希釈液はシシャモの精巣液のイオン組成¹⁷⁾をもとに人工精巣液を調製して用いた。その組成はNaCl 124.3mM、KCl 11.0mM、CaCl₂ 0.7mM、MgCl₂ 0.9mMとし、さらに、NaHCO₃とTAPSをそれぞれ20mMずつ添加するとともに、精子の運動を抑制するために1N-NaOHでpHを8.5に調整した¹⁵⁾。

供試サンプル

供試魚は1997年に諏訪湖より導入したワカサギ発眼卵から、当試験場において継代飼育している当年魚(継代数5)を使用した。保存する精子は腹部を圧迫すると生殖口から精液が放出する成熟雄魚の精巣精子を用いた。その雄魚から摘出した精巣を50倍量の希釈液と共にハサミで細かく切り刻んだものを、滅菌プラスチックシャーレに5ml分注して、これを保存溶液とし、4のインキュベーターにおいて冷蔵した。冷蔵保存実験には7尾の雄魚から得られた精巣精子から個体ごとに7つの保存溶液を作製して試験区とした。受精能を比較するための対照区には、各実験日に3尾の雄魚から輸精管精子を搾出・混合したものをを用いた。また、卵は排卵後24時間以内の雌個体5尾から採卵したものを混合して供試した。

保存精子の運動能

保存開始後、1~3日毎に保存精巣精子の運動能について観察をおこなった。精子の運動を測定するための溶液は、蒸留水をHEPES 20mM-NaOHでpH7.5に調整したBuffer solution(以下、BSという)を用いた¹⁸⁾。各保存溶液をマイクロピペットで3穴スライドグラスに分注し、精液の最終希釈率が1200倍となるようにBSを添加して、鋭利な木片で素早く攪拌した。作業は400倍の光学顕微鏡下でおこない、鏡筒に接続したCCDカメラ(HITACHI CCD color camera)から得た映像をビデオモニター(HITACHI CT-1450)に出力して精子の運動を観察した。運動精子比は太田他¹⁷⁾の方法により、

6段階に区分して判定した (Motility Score : 以下MSという)。つまり、BSで希釈した後に運動する精子の割合が目視で75%以上の場合を「5+」、50~74%を「4+」、25~49%を「3+」、24%以下を「2+」、極めて少数の場合を「1+」、すべて動かない場合を「0」とした。運動精子比の測定は各保存溶液につき3回ずつおこない、最も多く観察されたMS値を記録した。また同時に、保存溶液を20μl採取して、pHメーター (HORIBA B-211) でpHを測定した。

保存精子による人工受精

上記の運動能の観察と同日に精巣精子の受精能についても検討をおこなった。人工受精は卵重量に対して1/100量の各精液を受精させた。つまり、試験区では0.1gの卵に対して50μlの保存溶液を混合した後、50μlの蒸留水を添加して受精させた。対照区では搾出した輸精管精子を希釈液で50倍に薄めたものを、0.1gの卵に50μl混合した後、50μlの蒸留水を添加した。その後、それぞれの受精卵をスライドガラスに付着させて、流水下 (水温8.6~9.6) で管理し、発眼率とふ化率を観察した。

結 果

保存精子の運動能

冷蔵保存開始後の精巣精子のMS値を図1に示す。保存開始日のMSは4+~5+であったが、翌日には上昇して (P<0.05 : 以下同様) 5日目までは全ての試験区において5+を示した。7日目には4+~5+に低下したものの12日目まで3+~4+で横ばいに推移した。14日目では2+~4+と低下し、これ以降も下降傾向を示して19日目では0~2+となり、29日目には全て0であった。また、これらの期間における保存溶液のpH平均値は8.4~8.7の間で推移した。

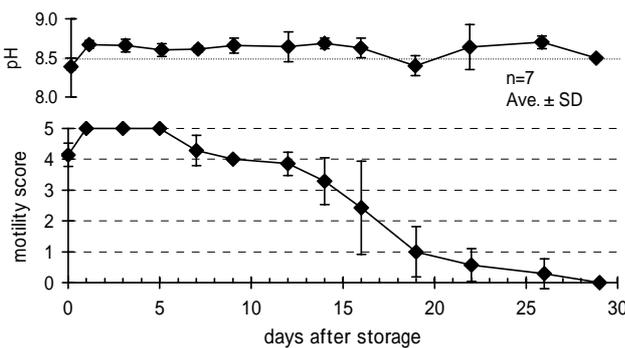


Fig.1 Patterns of motility score of testicular spermatozoa and pH of stock solution during chilled storage.

図1 冷蔵保存経過日数にともなう精巣精子の運動性指数と保存溶液pHの変化

保存精子の受精能

保存精巣精子による人工受精実験は、全ての精子運動活性が失活した29日目までの間に計13回おこなった。これら各実験における、搾出精子と受精させて得られた対照区の卵の発眼率とふ化率を表1に示す。発眼率は65.8

~88.2%、ふ化率は63.6~87.6%であり、両者とも各実験日によって異なる値が得られた。このことから、保存精巣精子と受精させて得られた各試験区の卵の発眼率とふ化率は、同日の対照区におけるそれらの率を100として換算し、それぞれを相対発眼率および相対ふ化率とした。

精巣精子の保存経過日数にともなう相対発眼率と相対ふ化率の変化を図2に示した。0日および1日目における平均相対発眼率はそれぞれ94.5%、91.1%であったが、その後上昇して (P<0.05 : 以下同様) 3~12日目までは91%以上の横ばいで推移し、14日目以降低下した。14日目では81.6%、19日目では39.1%、26日目では3.7%となり、29日目では0%となった。また、平均相対ふ化率も同様に推移し (P>0.05) 各実験日における試験区の平均ふ化率と平均発眼率の比は0.88~0.99 (平均0.96) であった。

Table 1 Hatching and eyeing rate (%) of eggs fertilized by semen spermatozoa in each experiment.

表1 各実験日において搾出精子と受精させた対照区の卵の発眼率とふ化率

stage	days													
	0	1	3	5	7	9	12	14	16	19	22	26	29	
eyeing	86.4	78.2	84.6	88.2	88.0	76.8	79.4	82.6	68.7	65.8	86.9	87.5	74.0	
hatching	86.4	74.8	82.4	87.6	85.0	73.5	78.6	81.8	63.6	63.7	86.1	82.6	74.0	

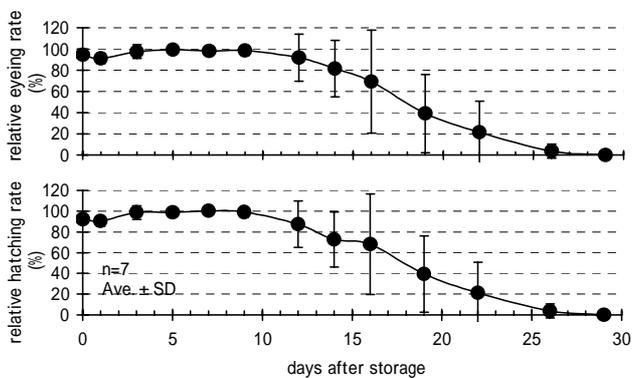


Fig.2 Patterns of relative eyeing / hatching rate of eggs artificially fertilized by stored testicular spermatozoa.

図2 精巣精子の保存経過日数にともなう相対発眼率と相対ふ化率の変化

運動能と受精能の関係

冷蔵保存した精巣精子のMS値と、この精子で受精した卵の相対ふ化率との関係を図3に示した。MSが5+, 4+の場合では、それぞれ平均96.1±6.5% (84.2~107.9%)、95.2±6.9% (80.8~105.5%)の相対ふ化率が得られた。一方、MSが3+では85.6±34.5% (41.4~125.4%)、MSが2+で66.7±32.6% (22.1~100.4%)、MSが1+で28.5±22.9% (3.9~69.9%)となり、MSが3+以下になると相対ふ化率は低下するとともに、ばらつきが大きくなる傾向が認められた。

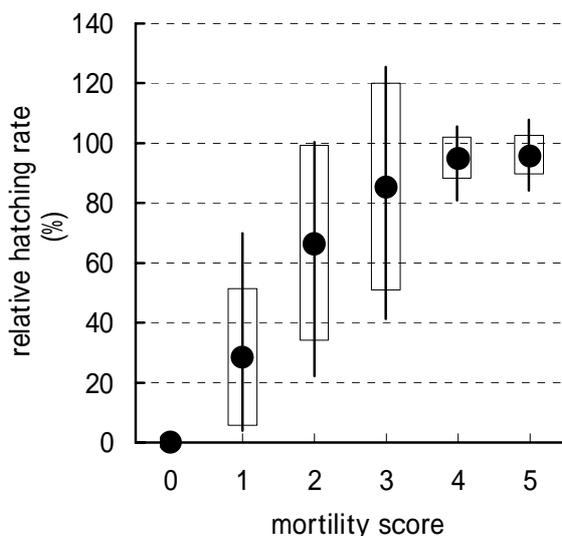


Fig.3 Relationship between motility score of stored testicular spermatozoa and relative hatching rate of eggs fertilized. Result are shown as average (●), standard deviation (transparent squares) and range (vertical bars).

図3 保存精子の運動性指数と受精により得られる卵の相対ふ化率の関係

考 察

野村⁷⁾はニジマスの遠沈した輸精管精子を5~10で保存し、7日目に57%のふ化率が得られることを認めており、宇野他¹⁾も同様に7日目でも生精子と同等のふ化率を示すとしている。また、サケでは搾出精液中の輸精管精子の冷蔵保存で、開始4日目に通常的人工受精と変わらぬ96.9%の受精率が得られるが、7日目では半分の53.8%に低下したとしている⁵⁾。これらの研究はいずれも精子を希釈していないが、冷蔵保存における希釈液の利用は運動能を保持するための重要な条件とされている^{9,18)}。高橋他⁸⁾はニジマスを供試魚として希釈液の組成と希釈法の検討をおこない、精巣精子の冷蔵保存で30日後においても52±10.3%のふ化率を得ることに成功している。一方、ワカサギでは、岡本他¹⁴⁾がドジョウの人工受精にも使用されるGPC-5(家畜精液保存液)で希釈した精巣精子を保存して、3時間まで受精能が保たれるとした。しかしながら、井塚¹⁵⁾はシヤマ用人工精巣液を希釈液とした実験で、10日前後にわたる高い運動能の保存を明らかにし、本種への有用性を示唆した。本研究でも、ワカサギの精巣精子をこのシヤマ用人工精巣液で希釈、冷蔵保存し、精子の受精能について検討したところ、開始12日目までは91%以上の高い相対発眼率が安定的に得られること、19日目においても約40%が得られることが明らかになり、本希釈液を使用する妥当性に証左を与えたといえよう。また、本研究における保存開始後の精子の運動性指数は、12日目までは高く横ばいに推移したのち徐々に低下しており、これは井塚¹⁵⁾が報告した結果とほぼ同等である。このことは、本保存技術の高い

安定性を示唆するものと思われ、現場への実用性においては利点になるものと考えられる。

冷蔵保存した精子を実際の種苗生産において利用する際には、人工受精作業の前に精子の運動活性を確認して予想されるふ化率などを予め捉えることにより、使用の可否を判断する必要がある。しかしながら、冷蔵保存精子の運動能と受精能を同時に調べた研究は少なく^{1,5)}、さらに経時的变化を観察した報告についてはほとんど見あたらない。本研究では、保存精子の運動能を示すMS値と得られる相対ふ化率との関係を明らかにした。これによるとMSが5+, 4+の場合はいずれも平均96.1、95.2%、最低でも80%以上の相対ふ化率が得られる。つまり、顕微鏡下で半数以上が運動する保存精子であれば、通常の搾出精子で受精した際の80%以上のふ化率が安定的に見込めるということになる。しかしながら、MSが3以下になると、得られるふ化率がばらつく傾向が認められた。これについては、人工受精に多数ロットの保存精子を使用するなどの対処法が有用であると思われる。

本研究では、ワカサギ精巣精子の保存日数に伴う精子の運動能と受精能の変化が明らかになった。今後は、生産事業規模において保存精子を利用した場合の、作業効率の低減や種卵生産目標の到達度などについても、その有用性及び汎用性を検討することとしたい。また、実用化に際しては大量の精子を保存することが前提になると思われるが、保存量や使用容器は精子の運動能に大きな影響を与えるので^{1,8,10)}、大量保存技術の開発も課題となる。

謝 辞

佐藤茂場長には有益な助言をいただき深謝申し上げます。また、奥村守氏、原かよ子氏には実験魚の飼育管理や採卵作業において支援をいただき、心から御礼申し上げます。

引用文献

- 1) 宇野将義・井野川仲男・黒倉 寿(1986): ニジマス・アマゴの人工受精への保存精液の利用 - 液状保存精液の精子活力と受精能力, 水産増殖, 34巻2号, 107-111.
- 2) 太田博巳(1992): 精子の凍結保存と精子活性, 養殖研ニューズ, No.24, 2-5.
- 3) 黒倉 寿(1994): 精子の凍結保存, 「精子学(毛利秀雄監修, 森沢正昭・星 元紀編)」, 東京大学出版会, 東京, 238-246.
- 4) 黒倉 寿(1983): - 総説 - 魚類精液の凍結保存, 水産育種, 8, 42-53.
- 5) 広井 修・安川雅夫・末武敏夫(1973): サケ・マス魚類の卵および精子の保存に関する研究 - 2 サケ(*Oncorhynchus keta*)精子の保存について, 北海道さけ・ますふ化場研究報告, 第27号, 39-44.
- 6) 橋本 進(1961): ニジマスの貯蔵精子の賦活について - 予報, 水産増殖, 9巻3号, 133-142.

- 7) 野村 稔(1964) : ニジマス的人工採卵に関する基礎研究 - , 淡水・等調液・体腔液・尿の希釈による精子の活動性と精液の貯蔵について, Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 30 (9), 723-733.
- 8) 高橋一孝・猪田利夫・森沢正昭(1987) : ニジマス精子の簡便な保存方法, 養殖, 1月号, 101-105.
- 9) 太田博巳・鷗沼辰哉・名古屋博之(2000) : アマゴ精子の冷蔵保存用希釈液と媒精溶液の検討, Nippon Suisan Gakkaishi, 66(1), 88-96.
- 10) 井戸本純一(2000) : アマゴ精子の氷温での保存, 平成10年度滋賀県醒井養鱒場業務報告, 40-41.
- 11) 神田美喜夫・石橋 制・中川 豊(1989) : アユの精液保存試験 - 精液の液状保存について - , 昭和62年度宮崎県水産試験場事業報告書, 402-407.
- 12) 棚野元秀(1988) : クロダイ精液の液状保存, 昭和62年度香川県水産試験場事業報告, 120-122.
- 13) 棚野元秀(2001) : サワラ等中間育成技術開発事業
サワラ精液の液状保存, 平成11年度香川県水産試験場事業報告, 108-113.
- 14) 岡本成司・河崎 正・高野 誠(1982) : ワカサギの人工種苗生産技術の開発に関する研究 - GPC-5精巢懸濁液による人工受精について, 茨城県内水面試験場調査研究報告, No.19, 38-43.
- 15) 井塚 隆(2002) : ワカサギ精巢精子の冷蔵保存用希釈液の検討, 神奈川県水産総合研究所研究報告, 第7号, 23-28.
- 16) 隆島史夫(1982) : 種苗生産, 「淡水養殖技術(野村 稔編)」, 恒星社厚生閣, 東京, 104-121.
- 17) 太田博巳・楠田 聡・工藤 智(1995) : シシャモ精巢精子の運動活性, Nippon Suisan Gakkaishi, 61(1), 7-12.
- 18) 辻 将治・池田和夫・太田博巳(2000) : アユ精子の運動開始を導くイオン環境の変化, Nippon Suisan Gakkaishi, 66(1), 55-61.