

魚類精液保存技術開発－Ⅰ

ヤマメ精液の凍結保存

高橋 昭夫

魚類精液保存に関する研究はサケ・マス類を中心に進められてきた。多くの研究者が唱えた魚類精液凍結保存の実用的意義あるいは目的を黒倉¹⁾は、①特定の形質を持った親魚の精液のより有効な利用を可能にする。②時間・空間的に離れた雌雄親魚間での交配を可能にする。③天然からの採捕によって親魚を入手する場合、雌雄親魚を同時に採捕する必要をなくす。④雌雄親魚の成熟期に違いのある魚種の種苗生産で行われている人工的な成熟制御・促進等の必要性をなくす。の4点に要約しており、種苗生産における必要性だけでなく育種技術の発展に重要な役割を果たすことを指摘している。最近は染色体を操作する育種技術が開発され、全雌生産に必要な性転換雄魚の作出が可能となったが、その精子を利用するためには凍結保存技術の開発が有効である。

今年度は、ヤマメを用いてペレット法により精液凍結保存技術の開発を目的に試験を行った。

材料及び方法

供試魚は当场で池中継代飼育しているヤマメ雌2尾、雄1尾を用いた。

精液の希釈には、第1表に示した Mounib's Solution¹⁾ と Mounib's Solution の改変液－1²⁾、2³⁾ 及び glucose 液³⁾を用い、精液希釈率は4倍とした。凍結保護物質と

してジメチルスルフォキシド（以下、「DMSO」と呼ぶ。）を7.5%添加した。希釈液にDMSOを混合した液で精液を希釈してから経過時間（以下、「平衡時間」と呼ぶ。）の影響を調べるため、平衡時間を1分以内、5分、10分及び15分とした。

希釈精液の予備冷却は実施しなかった。

凍結方法はドライアイス上に直径5mmの穴（深さ5mm）を開け、その穴に希釈精液0.1ccを滴下するペレット法で行い、凍結精液はドライアイス上に5分間放置し、その後、室温（16℃）で解凍、シャーベット状になった時に解凍液としてNaHCO₃ 120mMを0.5cc添加し精子の運動活性を調べた。活性のある解凍精子については、受精試験に用いた。

結果と考察

希釈液の検討

希釈液にDMSOを添加した液で精液を4倍に希釈し、直ちに希釈精液の精子運動活性を調べた。結果は第2表に示したとおり、Mounib's Solutionを除く各希釈液の精子はほぼ全部が活発な運動を示した。

今回の結果からヤマメ精液の希釈液としては、Mounib's Solutionの改変液とglucose液が適切と考えられた。

第1表 使用希釈液の種類

希 釈 液	組 成
Mounib's Solution	NaHCO ₃ 100mM, Sucrose 125mM, Glutathione 6.5mM
Mounib's Solution の改変-1	NaHCO ₃ 100mM, Sucrose 125mM, KCl 40mM, Glutathione 6.5mM
Mounib's Solution の改変-2	NaHCO ₃ 86mM, Sucrose 125mM, KCl 14mM, Glutathione 6.5mM
Glucose 液	Glucose 300mM

第2表 希釈精液の精子運動活性

希 釈 液	精子運動活性
Mounib's Solution	—
Mounib's Solution の改変-1	+++
Mounib's Solution の改変-2	+++
Glucose 液	+++

活性判定 +++：精子がほぼ全部動く
 ++：精子が50%動く
 +：精子の10~20%動く
 ±：精子の一部が動く
 -：精子が全部動かない

凍結精液の解凍時における精子運動活性

希釈後精子運動活性が全くない Mounib's Solution を除く各希釈液の精液を平衡時間 1 分以内にペレット法により凍結し、その後室温で解凍し、精液の精子運動活性を調べた。結果を第 3 表に示した。Mounib's Solution の改変-2 で精子の10~20%が動き、他の 2 種類ではわずかに運動する精子が認められるだけであった。

今回の結果からヤマメ精液を凍結するための希釈液としては、Mounib's Solution の改変-2 が有効と思われるが、解凍精液の精子運動活性を高めるために、希釈精液の予備冷却及び解凍方法についての検討が必要である。

平衡時間の違いによる凍結精液の解凍時における精子運動活性

平衡時間が 1 分以内で凍結し解凍した精液で精子運動活性が最も高かった Mounib's Solution の改変-2 を用いて平衡時間を 1 分以内、5 分、10 分、15 分とし、凍結精液の解凍時における精子運動活性の違いを調べた。結果を第 4 表に示した。

第4表 平衡時間の違いによる凍結精液の解凍時における精子運動活性

平 衡 時 間	精子運動活性
1 分以内	+
5 分	+
10 分	+
15 分	+

活性判定 +++：精子がほぼ全部動く
 ++：精子が50%動く
 +：精子の10~20%動く
 ±：精子の一部が動く
 -：精子が全部動かない

第3表 解凍精液の解凍時における精子運動活性

希 釈 液	精子運動活性
Mounib's Solution の改変-1	±
Mounib's Solution の改変-2	+
Glucose 液	±

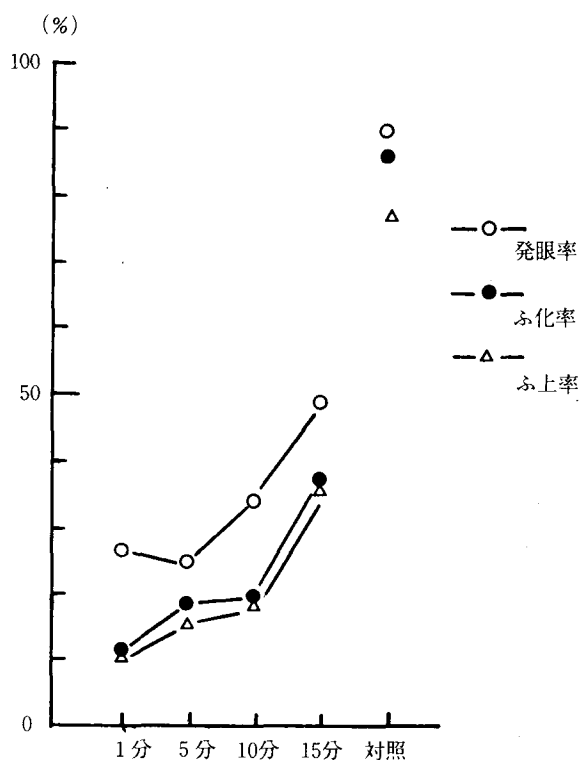
活性判定 +++：精子がほぼ全部動く
 ++：精子が50%動く
 +：精子の10~20%動く
 ±：精子の一部が動く
 -：精子が全部動かない

平衡時間が 1 ~ 15 分の範囲であれば精子運動活性には差が見られなかった。

今回の試験結果から、希釈後15分までは精子運動活性に差がないことで、時間的猶予があり、ペレットを量産するうえで支障が少ないと考えられるが、解凍精液の精子運動活性を高める必要がある。

凍結精液を用いた受精試験

希釈液に Mounib's Solution の改変-2 を用い、平衡時間を 1 分以内、5 分、10 分、15 分とし、ペレット法により凍結した精液を解凍し、受精試験を行った。結果を第 5 表、第 1 図に示した。



第1図 平衡時間の違いによるヤマメ凍結精子を用いた発眼率、ふ化率及びふ上率 対照：生精子

第5表 凍結精液を用いた受精試験結果

区	平衡時間	卵 数	発眼率	ふ化尾数	ふ化率	浮上尾数	浮上率	奇形尾数	備 考
1	1分以内	150 粒	26.7%	17尾	11.3%	15尾	10.0%	1 尾	
2	5 分	150	24.7	27	18.0	23	15.3	3	
3	10分	150	34.0	29	19.3	28	18.7	0	
4	15分	150	48.0	56	37.3	55	36.7	2	
対照	—	150	90.0	129	86.0	116	77.3	2	生精液

平衡時間1分以内の1区はふ化率11.3%浮上率10.0%、平衡時間5分の2区はふ化率18.0%浮上率15.3%、平衡時間10分の3区はふ化率19.3%浮上率18.7%、平衡時間15分の4区はふ化率37.3%浮上率36.7%と平衡時間が長くなるほどふ化率、浮上率が高くなった。黒倉¹⁾は平衡時間が短いほど良い結果が得られるとしているが、今回の試験では逆の結果が得られた。しかし、ふ化率、浮上率を生精子（対照）と比較すると凍結精子が低く、解凍方法等について改良が必要である。

今後は解凍方法の検討とともに、凍結方法もペレット法以外の液体窒素蒸気による方法、液体窒素に浸す方法及び申の単管法を用いた試験を実施する必要があると考えられる。

要 約

- 1) ヤマメ精液をペレット法により凍結保存する条件について、希釈液、平衡時間を検討し、凍結精液を用いた受精試験を実施した。
- 2) ヤマメ精液の希釈液として今回用いたものでは、

Mounib's Solution を改変したもの（NaHCO₃を14mM減らしKClを14mM添加）が精子運動活性も10～20%で最も良かったが、まだ、精子運動活性が低く、希釈精液の予備冷却及び解凍方法の検討が必要である。

- 3) 平衡時間を1分以内から15分まで5分おきに調べた結果、解凍時の精子運動活性には差が見られなかったものの、受精試験では、平衡時間が長くなるにつれてふ化率、浮上率とも高くなった。しかし、生精子のふ化率、浮上率と比較すると凍結精子は低く、解凍方法等について改良が必要である。

文 献

- 1) 黒沢 寿（1983）：魚類精液の凍結保存，水産育種，8，42～53.
- 2) 三城 勇（1987）：ニジマス精液の凍結保存試験，昭和61年度長野県水産試験場事業報告，12～13.
- 3) 北海道立水産孵化場（1990）：精子保存技術に関する研究，昭和63年度事業成績書，139～143.