

養殖対象魚の精子凍結保存方法

太田博巳, 横井謙一

(人工種苗グループ)

近畿大学大学院農学研究科

一般に魚介類の雌は一度に排卵する卵数が極めて多く、しかも排卵後の卵質の低下速度が速いため、種苗生産の現場ではそれらをまとめて人工授精し、大型の水槽で飼育管理を行うことが多い。また、魚類の精子は運動時間の短いことが特徴として挙げられ、中でも運動時間が短いことで知られるサケ科魚類では、淡水で希釈されて運動を開始して 30 秒程度、¹⁾アユではおよそ 10 秒以内に全ての精子が運動を停止する。²⁾また、魚類の卵の直径は1mm以上と大きく、環境水中で受精卵を保護する厚くて丈夫な卵膜に覆われている。魚類の精子は先体を持たず、卵膜の動物極部位にただ一カ所開いた卵門と呼ばれる、精子一尾がようやく通れる程のトンネル様通路内を遊泳し、卵細胞膜との接着を果たす。³⁾このように魚類の受精現象は卵と精子が出会うための制限因子が多く、確実な人工授精を行うには媒精する精子の数と、その活力に十分な注意を払う必要がある。

魚類精子の保存方法は、1~2日から1ヶ月程度の保存を目的とする冷蔵保存と、それ以上の保存を目的とする凍結保存に大別される。精子の凍結保存技術はストロー等の保存容器が大量受精に適さないことや、凍結・解凍に伴う精子活性の低下等が制限要因となり、種苗生産現場で利用される例は限られてきた。これらの用途には簡便性と利便性を備えた冷蔵保存精子が利用されることが多く、^{4, 5)}凍結保存技術は育種作業や希少種の遺伝子保存といった、少量授精の支援技術とし

て発達してきた。しかし、栽培漁業における放流種苗では遺伝的な多様性が重要視されるようになり、計画的に多数の親魚を用いた交配が可能で、凍結保存精子の有用性が再認識されるようになった。

本 GCOE プロジェクトにおいて、我々は養殖対象種の育種作業を支援する技術の開発を目的として、魚介類精子の凍結保存方法のマニュアル化を目指している。これまでに多くの魚種で、凍結解凍後の精子の運動活性を指標として、ストロー法による最適な手法を検討してきたので、その進捗状況を報告する。

精子を凍結保存する際に、その生存性を左右する技術的選択肢としては、凍害防御剤の種類と濃度、凍害防御剤を希釈する溶液の組成、冷却速度、液体窒素に浸漬するまでの予備凍結温度等が挙げられる。それぞれの条件について、調べた結果を以下に述べる。

凍害防御剤と希釈液

魚類精子の凍害防御剤として dimethylsulfoxide (DMSO), glycerol, methanol (MeOH), dimethylformamide (DMF), dimethylacetamide (DMA) がそれぞれの種により使い分けられてきた。⁶⁾このうち、海産魚のほとんど、淡水魚の多くで、DMSO を使用するのが一般的である。⁷⁾近年、主に淡水魚を中心として DMSO よりも MeOH の方が

解凍後の精子運動率や受精率が高いという報告例が増えつつある。^{2, 8, 9)}

Fig.1 は近畿大学で養殖したクロマグロ雄の精子を凍結保存する際の凍害防御剤の種類を検討した結果を示している。種々の凍害防御剤を10%, その希釈液として90%のウシ胎児血清(FBS)からなる保存液で精液を希釈し, 冷却速度 $-41^{\circ}\text{C}/\text{分}$, 液体窒素に浸漬する前の予備凍結温度 -50°C で凍結保存を行った。次に数日間の保存の後に解凍した後, 精子運動を導くために450 mM NaCl 液(20 mM HEPES を加え pH 7.5 に調整)で希釈15 秒後の運動率を示している。この結果をみてもわかるように, クロマグロ精子の凍害防御剤としては DMSO, DMA, DMF が適していた。同様に, 解凍後の運動率を指標として DMSO を希釈する溶液の種類について, FBS, クロダイの精漿のイオン組成¹⁾を模した人工精漿(ASP), そしてサケ科魚類の希釈液として頻用されるグルコースの等張液(300 mM 溶液)で比較を行ったところ, 希釈液は種類による影響は少ない結果となった(Fig.2)。

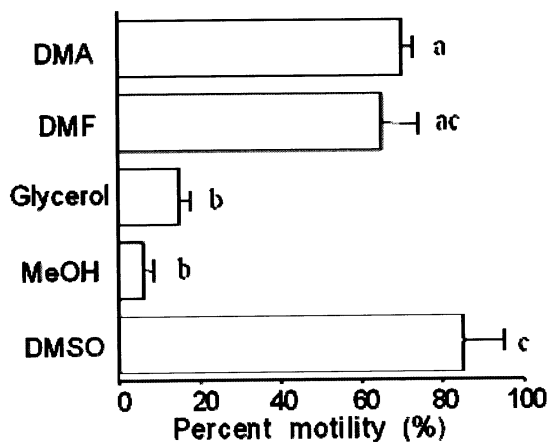


Fig. 1. Post-thaw motility of Pacific bluefin tuna spermatozoa cooled with 90% FBS and 10% cryoprotectant as indicated.

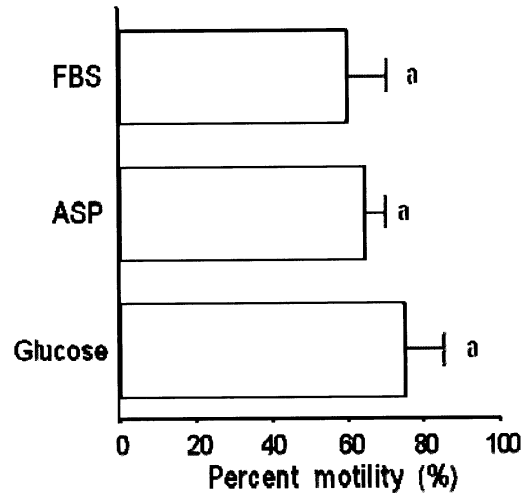


Fig. 2. Post-thaw motility of spermatozoa cooled with 10% DMSO and 90% diluent as indicated. FBS, fetal bovine serum; ASP, artificial seminal plasma; Glucose, 300mM glucose.

いずれにせよ, 液体窒素中で保存した後のクロマグロ精子の運動率は凍結前と比較して80%前後を維持し, 本種の精子は凍結保存に対する耐性の強いことが明らかとなった。これまでに同様な手法で解凍後の運動率を指標として, 養殖対象種のそれぞれに適した保存用溶液の組成を検討してきた。その結果, Table 1にその主要な結果をまとめてみた。この結果をみると, 凍害防御剤は種によってDMSOかMeOHのいずれかが適しており, その至適濃度はいずれにせよ10%, 希釈液はFBSが適していることが明らかとなった。

冷却速度と予備凍結温度

細胞を凍結保存する場合, 電子制御で冷却方法をコントロールするプログラムフリーザーという装置が市販されている。この装置は比較的正確に冷却速度や予備凍結温度を制御可能であるが, 高価かつ大型で, 携帯しての利用は困難である。我々は種苗生産現場に出かけて精子保存を行ったり, フィールドでサンプリングすることを前提

Table 1. Optimum methods for sperm cryopreservation in cultured fishes.

Species	Amago salmon	Ayu fish	Japanese eel	Pacific bluefin tuna	Chub mackerel	Seven-band grouper
Family	Salmonidae	Osmeridae	Anguillidae	Scombridae	Scombridae	Serranidae
Cryoprotectant (CP)	MeOH	MeOH	MeOH	DMSO	DMSO	DMSO
Concentration of CP	10%	10%	10%	10%	10%	5~10%
Diluent	FBS	FBS	FBS+ASP	FBS	FBS	FBS
Cooling rate (°C/min)	-40	-40	-10	-50	-50	-40
Reached temperature	-50	-50	-50	-50	-50	-50

として、液体窒素液面上の一定の高さに保存容器であるストローを固定し、一定温度(予備凍結温度)まで冷却して急速に液体窒素に浸漬する、二段階凍結法の開発を目指している。ストロー内の冷却速度と液体窒素に浸漬する前の予備凍結温度は、直径 0.1 mm の熱電対でモニタリングし、各魚種の冷却速度と予備凍結温度の最適条件を検討した。また、冷却速度はサンプルが 0°C から -40°C に達するまでの平均の温度変化として測定している。⁹⁾

各魚種において、凍結・解凍後の運動精子比率が最も高い冷却速度、予備凍結温度を調べた結果を Table 1 に示した。冷却速度は種による違いが大きいが、予備凍結温度は -50°C がいずれの場合も適していた。冷却速度は細胞内自由水の凍結脱水量を大きく左右するが、その最適条件が種によって大きく異なるという興味深い現象が認められた。

まとめ

以上述べてきたように、これまでに多くの魚種で精子の最適凍結条件を調べてきたが、凍害防御

剤の種類と冷却速度の2つは種による違いがあり、それ以外の条件はほぼ共通であることが明らかとなった。凍害防御剤については今のところ DMSO か MeOH のいずれかという選択肢となっている。ある魚種の精子を初めて凍結保存する場合、これらの条件のみを予備的に調べることにより、効率的な保存が可能になると考えられた。

これまでの実験結果から、淡水魚の精子と海産魚の精子を比較すると、それぞれの種に適した方法で凍結・解凍した後の運動率は、海産魚の方が著しく高い傾向を示した。また、排精の開始期、中期、後期といった成熟状態の違いにより、解凍後の運動率が大きく異なる種も認められた。¹⁰⁾ 現在、これらの違いがなにに起因するのかについて、生化学的、分子生物学的な手法を用いて解析中である。

文 献

- 1) Morisawa M. Initiation mechanism of sperm motility at spawning in teleosts. *Zoological Science*. 1985; **2**: 605-615.
- 2) 津高窓加ほか. アユ精子の凍結保存方法.

- 日本水産学会誌. 2006; **72**: 34-40.
- 3) 岩松鷹司.[魚類の受精], 培風館, 1-195 (2004)
- 4) Ohta H, Izawa T. Diluent for cool storage of the Japanese eel (*Anguilla japonica*) spermatozoa, Aquaculture. 1996; **142**: 107 – 118.
- 5) 藤浪祐一郎ほか. アカアマダイ漁獲鮮魚から採取した精巣精子の運動活性と冷蔵保存. 日本水産学会誌. 2003; **69**: 162-169.
- 6) 楠田 聡. 魚類精子と胚細胞の凍結保存における現状と展望. 水産育種. 2004; **34**: 1-25.
- 7) Gwo JC. Cryopreservation of aquatic invertebrate semen: a review, Aquaculture Research. 2000; **31**: 259-271.
- 8) Lahnsteiner et al. Methanol as cryoprotectant and the suitability of 1.2 ml and 5ml straws for cryopreservation of semen from salmonid fishes, Aquaculture Research. 1997; **28**: 471-479.
- 9) Ohta et al. Cryopreservation of the sperm of the Japanese bitterling. Journal of Fish Biology. 2001; **58**: 670-681.
- 10) Yokoi et al. Differences in post-thaw motility of spermatozoa between land-locked and amphidromous forms of ayu (*Plecoglossus altivelis*). Aquaculture. 2009; **292**: 42-45.