

成熟促進ホルモンの投与がアユ精子の凍結保存耐性に及ぼす影響

横井謙一¹ 滝井健二² 太田博巳¹

(人工種苗グループ, 養殖グループ)

¹近畿大学大学院農学研究科, ²近畿大学水産研究所

精子の凍結保存技術は、遠隔地での交配や成熟期の異なる同種・異種間での交配を可能にし、また、優れた形質を持つ配偶子を選択的に利用するなど、効率的な種苗生産を行う技術として有効である。¹⁾ 精子の凍結保存方法を開発するためには、凍結保存する際に精子を希釈する保存液の組成や冷却条件について検討する必要がある。²⁾

アユ (*Plecoglossus altivelis*) は、我が国の代表的な養殖対象種で、産業的価値が高く、盛んに種苗生産が行われている。近年、種苗生産の効率化を図るため様々な技術開発がなされており、精子の凍結保存技術もそのひとつである。³⁾ これまでの研究で、同じ方法を用いてアユの精子を凍結保存しても、凍結解凍後の精子の運動率は成熟時期によって大きく変動することが明らかとなってきた。⁴⁾ すなわち、繁殖前期の凍結解凍後の精子の運動率は、ほぼすべてが 20%以下であったのに対し、繁殖後期では 20%以上の高い値を示した。さらに、それらの新鮮精子の運動率を測定してみると、繁殖前期の運動率は、個体ごとに大きく変動するのに対し繁殖後期ではほぼすべての個体で 100%の値を示した。このことから、雄成熟度の上昇が精子の凍結保存耐性に影響を及ぼしている可能性が考えられた。そこで本研究では、雄の成熟度の違いが精子の凍結保存耐性に及ぼす影響を調べるため、成熟した雄アユに成熟を促進するホルモンを投与し、新鮮精子および

凍結解凍後の精子の運動率の変化を調べた。

材料および方法

供試魚と精液採取 実験には湖産系アユの雄 67 尾を用いた。全長と魚体重の平均は、それぞれ $217.3 \pm 1.3\text{mm}$, $70.1 \pm 1.5\text{g}$ であった。供試魚を 0.1% 2-フェノキシエタノールで麻酔した後、飼育水や尿などが混入しないよう慎重に腹部を圧迫して生殖口から染み出た精液をピペットで採取した。得られた精液は 1.5ml のプラスチック製チューブに収容し、室温で保存した。精液は、採取後すぐにスパーマトクリット値(精液中に占める精子細胞の割合)を測定し、運動解析および凍結保存に使用した。また、精巣重量を測定し、生殖腺重量指数 ($\text{GSI} = \text{精巣重量} / \text{魚体重} \times 100$) を求めた。

ホルモン投与 1 回目のホルモン投与を実施する前に、排精を確認した 10 尾の雄の精液を採取し、未処理群として精子の運動率を測定した。本実験では、成熟を促進するホルモンとして、サケ脳下垂体抽出物 (SPE) とアユの最終成熟誘起ステロイドとして知られる 17, 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP) を用いた。ホルモンの調整は、すべて投与直前に行なった。SPE は、サケ下垂体を 0.9% NaCl 溶液中で 10 分間ホモジナイズした後、1400 \times g で 10 分間遠心分離して得た上澄みを使用した。DHP は、エタノールに溶解し同

量の 0.9% NaCl 溶液で希釈してから使用した。

排精を確認した 57 尾の雄を 2 グループの SPE 投与群, 2 グループの DHP 投与群, コントロール群の 5 グループに分けた。SPE は, それぞれ 0.2mg/魚体重(g)/日 (n=10), および 0.6mg/魚体重(g)/日 (n=17) の濃度で投与した。DHP は, それぞれ 2μg/魚体重(g)/日 (n=10), および 10μg/魚体重(g)/日 (n=10) の濃度で投与し

た。コントロール群 (n=10) には 0.9% NaCl 溶液を投与した。ホルモン投与を行なう際は, 2-フェノキシエタノールで麻酔を施した後, 27G の注射針を用いて腹腔内に注射した。ホルモン投与は十分な投与効果を得るため 3 日間連続で行った。精液の採取は 3 回目の投与から 24 時間後に実施した。

Table 1 Gonad somatic index (GSI) and spermatocrit in ayu males treated with saline (control), 2 doses of salmon pituitary extract (SPE, 0.2 mg or 0.6 mg gmBW⁻¹) and 2 doses of 17, 20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP, 2 μg or 10 μg gmBW⁻¹)

	Non treatment (10)*	Control (8)	SPE 0.2 (4)	SPE 0.6 (9)	DHP 2 (8)	DHP 10 (9)
GSI	13.2±0.9	12.2±0.6 ^{ac}	5.3±0.6 ^b	9.8±0.9 ^a	12.5±0.8 ^{ac}	12.8±0.6 ^c
Spermatocrit (%)	47.1±2.3	70.8±5.8 ^a	50.1±3.5 ^b	46.5±1.0 ^b	40.3±4.4 ^b	38.4±4.1 ^b

* The numeral in parenthesis represents the number of individuals in each group.

** Means with different letters are significantly different (*P* < 0.05).

運動解析 精子の運動開始を導くため, 精液を淡水 (蒸留水に 20mM HEPES を加え pH を 7.5 に調整) で, 1:2999 (新鮮精液) および 1:59 (解凍後精液) に希釈して攪拌した (最終希釈比 3000 倍)。これらの混合液 8μl を 21 穴ホールスライドグラス上にとり, 精子の運動の様子を光学顕微鏡に接続したビデオカメラとビデオタイマーを通してビデオレコーダーに 20 秒間録画した。ビデオタイマーの記録は, 精液を淡水に希釈すると同時に開始した。精子は頭部の前進運動が認められた場合を運動精子として計数し, 運動開始後 3~4 秒後の運動率をスロー再生動画から求めた。精子の運動率は, 一定視野内から無作為に選んだ 50 個以上の精子のうち, 運動している精子の割合を百分率で示した。測定は各個体で 2 回繰り返して行ない, 平均値をその個体の測定値とした。さらに, 凍結解凍後の相対運動率 (凍結保存耐性) は凍結前の運動率を 100 とした時の相対値に換算して求め

た。

凍結保存 精子の凍結保存は津高ほか³⁾ の方法に従った。まず, 得られた精液を 10% のメタノールと 90% のウシ胎児血清からなる保存液で 50 倍に希釈し, アクリル製のストロー (長さ 110mm, 内径 2mm) に 150μl 注入した。ストローの両端は, ストローパウダーを用いて封入した。冷却には, 液体窒素を 5cm 程度の深さで入れたステンレス製

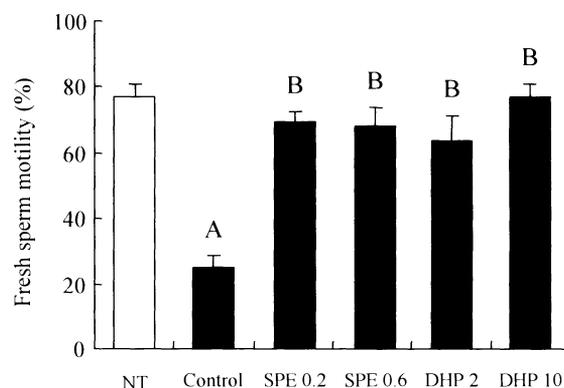


Fig. 1. Effect of 3-day consecutive hormone injections on sperm motility before cryopreservation. Male ayu were injected with salmon pituitary extract (SPE, 0.2 mg or 0.6 mg gmBW⁻¹) or 17, 20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP, 2 μg or 10 μg gmBW⁻¹). Values represent the mean ± S.E. of 4 to 9 individuals. Bars with different letters are significantly different. The non-treated group is designated NT.

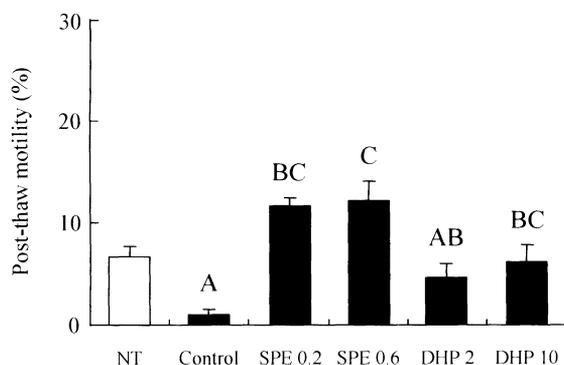


Fig. 2. Effects of the 3-day consecutive hormone injections on post-thaw motility of ayu spermatozoa. Values represent the means \pm S.E. of 4 to 9 individuals. Bars with different letters are significantly different. The non-treated group is designated NT.

容器(内径19cm, 高さ27cm)を使用し, ストローは液体窒素液面(高さ7.5cm)に浮かべた発泡スチロール製台座の上に設置して冷却した。ストロー内の温度変化は, 熱電対(直径0.1mm)を挿入した別のストローを近接に設置し, レコーダーで記録した。サンプルの温度が -50°C に達した時点でストローを液体窒素中に浸漬し凍結を完了し, 24時間以上保存した。なお, 冷却速度($-45.8 \pm 0.8^{\circ}\text{C}/\text{分}$)は, 0°C から -40°C までの冷却に要した時間から算出した。解凍は, 凍結されたストローを常温(約 20°C)の水を入れた5lの容器に10秒間浸漬して行なった。

統計解析 測定値はすべて平均値 \pm 標準誤差で示し, 運動率の有意差検定には角変換した値を用いた。有意差の検出にはTukey-Kramer多重比較法を用い, 有意水準は5%とした。

結果

ホルモン投与後の各試験群の生残個体数は, それぞれ8個体(コントロール群), 4個体(0.2mg SPE投与群), 9個体(0.6mg SPE投与群), 8個体(2 μg DHP投与群), 9個体(10 μg DHP投与群)

であった。

未処理群(n=10)のGSIとスパーマトクリット値は, それぞれ $13.2 \pm 0.9\%$ と $47.1 \pm 2.3\%$ であった(Table 1)。新鮮精子と凍結解凍後の精子の運動率は, $77.3 \pm 3.8\%$ (Fig. 1), および $6.7 \pm 1.0\%$ (Fig. 2)であった。相対運動率は $8.5 \pm 1.3\%$ (Fig. 3)を示した。

0.9% NaCl 溶液を投与したコントロール群の

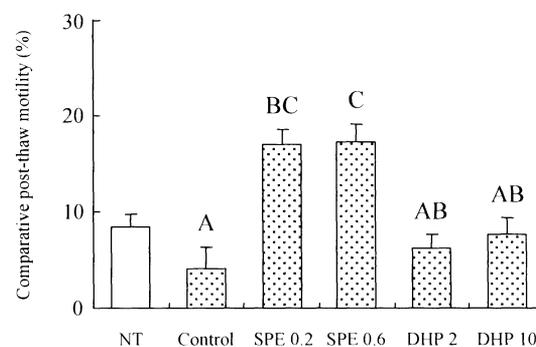


Fig. 3. Effects of the 3-day consecutive hormone injections on the comparative post-thaw motility of ayu spermatozoa. The comparative post-thaw motility is calculated using the following formula: sperm motility after cryopreservation/sperm motility before preservation $\times 100$. Values represent the means \pm S.E. of 4 to 9 individuals. Bars with different letters are significantly different. The non-treated group is designated NT.

GSIとスパーマトクリット値は, それぞれ $12.2 \pm 0.6\%$ と $70.8 \pm 5.8\%$ であった(Table 1)。新鮮精子の運動率($24.9 \pm 4.0\%$)は未処理群よりも有意に低い値を示した(Fig. 1)。さらに, 凍結解凍後の精子の運動率($1.0 \pm 0.4\%$)および相対運動率($4.0 \pm 2.3\%$)はきわめて低い値であった(Figs. 2,3)。

0.2mg SPE投与群のGSI($5.3 \pm 0.6\%$)は, 0.6mg SPE投与群($9.8 \pm 0.9\%$)より有意に低い値を示し, それらのスパーマトクリット値($50.1 \pm 3.5\%$, $46.5 \pm 1.0\%$)は, コントロール群よりも有意に低かった(Table 1)。一方で, 0.2mgと0.6mg SPE投与群の新鮮精子の運動率($69.4 \pm 3.1\%$, $67.9 \pm 6.1\%$)は, コントロール群よりも有意に高い値を示し(Fig. 1), 凍結解凍後の精子の運動率

($11.7 \pm 0.8\%$, $12.1 \pm 1.9\%$)もコントロール群より有意に高かった(Fig. 2)。同様に、0.2mgと0.6mg SPE 投与群の相対運動率($17.0 \pm 1.6\%$, $17.2 \pm 1.9\%$)はコントロール群よりも有意に高い値を示した($4.0 \pm 2.3\%$) (Fig. 3)。スパーマクリット値と運動率については、SPE 投与群間に有意差は認められなかった。

2 μ gと10 μ g DHP 投与群のGSIは、 $12.5 \pm 0.8\%$ および $12.8 \pm 0.6\%$ で、コントロール群との差は認められなかった。スパーマクリット値($40.3 \pm 4.4\%$, $38.4 \pm 4.1\%$)はコントロール群に比べて有意に低い値を示した(Table 1)。各DHP 投与群の新鮮精子の運動率と凍結解凍後の精子の運動率は、 $63.8 \pm 7.4\%$ および $77.2 \pm 4.0\%$ (Fig. 1)、 $4.6 \pm 1.4\%$ および $6.2 \pm 1.6\%$ であった(Fig. 2)。10 μ g DHP 投与群の凍結解凍後の精子の運動率は、コントロール群に比べて有意に高い値を示した。しかしながら、2 μ gと10 μ g DHP 投与群の相対運動率($6.2 \pm 1.4\%$, $7.6 \pm 1.8\%$)は、0.6mg SPE 投与群よりも有意に低い値を示し、コントロール群と0.2mg SPE 投与群との差は認められなかった(Fig. 3)。

考察

0.9% NaCl 溶液を投与したコントロール群の新鮮精子の運動率は、未処理群よりも有意に低い値を示した。対照的に、SPE および DHP 投与群の新鮮精子の運動率が低下することはなかった。このことは、注射による雄個体へのストレスが新鮮精子の運動率を低下させる要因になった可能性を示唆する。魚類精子の質は、様々なストレスによって影響を受ける。⁵⁾ また、イオン環境を種々の濃度に調整した人工精漿中でアユの精子を数

時間培養すると、そのイオン環境の条件によっては運動能を喪失することが知られている。⁶⁾ これらのことから、繰り返しの注射による雄個体への過度のストレスは、輸精管内の精漿のイオン環境を変化させ、その結果として精子の運動能を喪失させた可能性が考えられた。よって、本研究で得られた実験結果を明確に評価するためには、ホルモン投与群と未処理群の比較ではなく、ホルモン投与群と0.9% NaCl 溶液を投与したコントロール群との比較が必要である。

新鮮精子の運動率は、コントロール群よりもSPE 投与群およびDHP 投与群で顕著に高い値を示した。魚類の最終成熟誘起ステロイドとして知られているDHPは、雄の最終成熟においても重要な役割を担っている。例えばサケ科魚類では、DHPが精漿のpHを変化させ、それにより精子細胞内のcAMP濃度を上昇させ、精子の運動能の獲得を促進する働きを持っている。⁷⁾ このことから、SPE 投与による新鮮精子の運動率の上昇は、SPEに含まれる生殖腺刺激ホルモンがDHPの分泌を刺激し、DHPを介した精漿のイオン環境の変化によって引き起こされたと考えられる。

SPE 投与群の雄個体の生残率は、他のグループに比べて低かった。アユは生まれてから1年で成熟し、繁殖後に死亡する。そのため、SPE 投与群の高い死亡率は、成熟が促進された結果と考えられた。

精子の凍結保存の過程において、どのような因子が精子の生存性を左右するかについては、ほとんど知られていない。本研究の結果より、SPEの投与は精子の凍結保存耐性を効果的に上昇させるが、DHPの投与はそれらの向上にほとんど効果がないことが明らかとなった。このことは、SPE 投与による精子の凍結保存耐性の上昇は、生殖

腺刺激ホルモン—DHP 系を介した反応ではない可能性を示唆している。このことから SPE 投与による精子の凍結保存耐性の上昇は, SPE に含まれる生殖腺刺激ホルモン以外のホルモン(甲状腺刺激ホルモン, 副腎皮質刺激ホルモン, 成長ホルモンなど), あるいは DHP 以外の性ステロイドホルモンの効果である可能性が高い。よって, 今後は今回使用したホルモン以外のホルモンを投与し, 精子の凍結保存耐性がどのように変化するかを明らかにする必要がある。

文献

- 1) Suquet et al. Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquaculture Research*. 2000; **31**: 231–243.
- 2) Lahnsteiner F. Semen cryopreservation in the Salmonidae and in the northern pike. *Aquaculture Research*. 2000; **31**: 245–258.
- 3) 津高ほか. アユ精子の凍結保存方法. 日本水産学会誌. 2006; **72**: 34–40.
- 4) 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.
- 5) Kime DE, Nash JP. Gamete viability as an indicator of reproductive endocrine disruption in fish. *Science of the Total Environment*. 1999; **233**: 123–129.
- 6) Ohta et al. Effects of bicarbonate ions and pH on acquisition and maintenance of potential for motility in ayu, *Plecoglossus altivelis* Temminck et Schlegel (Osmeridae), spermatozoa. *Aquaculture Research*. 2002; **32**: 385–392.
- 7) Miura et al. Spermatogenesis in the Japanese eel. In Aida et al. (eds) *Eel biology*. Springer Verlag, Tokyo: 2003; 319–329.