

【研究報告】

ヤイトハタの安定採卵に向けた技術開発 —精子凍結保存技術— (沖縄県産業振興重点研究推進事業)

田村 裕*, 松田誠司, 新垣優志朗

Sperm cryopreservation technique in Malabar grouper *Epinephelus malabaricus*

Yu Tamura*, Seiji Matsuda and Yushiro Arakaki

メチルテストステロンで雄性化処理したヤイトハタ 2 個体の精子を 11.5%トレハロース水溶液で希釈し、液体窒素中で保存した。凍結保存 29 日後に解凍した凍結精子の評価を行い、同じ個体から得た新鮮精子と比較した。凍結精子の浮上卵率は 37.5~52.6%と新鮮精子よりも 20 ポイント以上低い結果となった。一方、凍結精子の受精率は 78.4~86.5%であり、新鮮精子と同程度か凍結精子の方が高く、凍結保存 29 日後も精子が受精能力を有していることが確認された。凍結精子の活性は、新鮮精子と比べて低く、運動精子密度も 2.0~72.1%と新鮮精子よりも低い値で推移した。本種の場合はクエやマハタと比較して、搾出で得られる精子量が極めて少ないことから、凍結精子では全ての未受精卵を受精させるために必要な受精能力のある運動精子が足りない可能性が示唆された。今回の結果からは、11.5%トレハロース水溶液を用いた凍結保存の場合、種苗量産に最低限必要な浮上卵量 100g を得るためには、少なくとも 2.0mL 以上の精子が必要となると推定された。

ヤイトハタは、本県の主要養殖対象魚で、養殖種苗の全数を県が供給している。種苗生産のための受精卵は水槽内での自然産卵によって確保されているが、雄親魚の保有数が非常に少なく、2016 年には雄親魚の斃死によって、必要な受精卵量を確保できない事態に陥った。このことから、本種の安定的な種苗供給のためには、万が一自然産卵による受精卵供給ができない場合に備え、人工授精をはじめとする複数の採卵技術を開発する必要がある。

そこで、本事業では、ヤイトハタの採卵方法の多様化に向けて雌の排卵誘導および人工授精技術の開発を行っている。人工授精においては、雄親魚の数だけでなく、搾出で得られる精子量の少なさが受精卵量の制限要因となっていることから、人工授精のタイミングで万が一精子量が不足した場合のバックアップ手段として、精子凍結保存技術開発を行うこととした。

材料及び方法

(1) 精子の採取と評価

本事業の雄性化試験において、メチルテストステロンで雄性化処理した若魚個体を 2023 年 3 月 28 日に麻酔 (FA100, 13.3ppm) し、腹部を圧迫して総排泄孔から精子が分泌されるか確認した。精子が分泌される場合は、ポリエチレン細管 (外径 2.33mm, 長さ 17.5mm) に採取し、細管をポリプロピレン製遠沈管に入れてクラッシュアイスにさし、凍結まで

家庭用冷蔵庫 (0℃) で保管した。

採取した精子は活性と運動精子率を測定した。精子 2μL をスライドガラス上に採り、顕微鏡 (Nikon ECLIPSE-90i 倍率 100) 視野下で精子が動いていないことを確認した。次に、砂濾過海水 300μL を滴下し、カバーガラスをかけ、直ちに顕微鏡視野下で精子の動きを観察した。活性は渋谷 (2016) の方法に従い、精子の 50%以上が運動する場合を「3+」、50~10%が運動する場合を「2+」、10%未満が運動する場合を「1+」、すべて運動しない場合を「0」とした。

海水滴下 5 分後から 30 秒間、顕微鏡視野 (倍率 200) 下の動画を撮影した。撮影した動画を 1 コマずつのコマ送りが可能な画面上で再生し、無作為に選んだ精子 100 個の運動の有無を記録して、運動している精子の割合を運動精子率とした。位置が移動せず、その場で震えているものは停止とした。

(2) 精子凍結と解凍

2023 年 3 月 28 日に精子の凍結を行った。海産魚類の凍結保存においては凍害防御剤として dimethylsulfoxide (DMSO)、希釈液にウシ胎児血清が用いられることが一般的だが (太田, 2011)、DMSO は細胞毒性を有すること、ヤイトハタと同属のマハタにおいて、トレハロース水溶液単独で凍結した精子で有効な結果が報告されている (宮木ほか, 2006) ことから、本研究でもトレハロース (トレハロー

*E-mail : tamuray@pref.okinawa.lg.jp 石垣支所 (現所属 : 沖縄県八重山農林水産振興センター農林水産整備課)

スニ水和物, Wako) を用いることとした。宮木ほか (2006) の方法に従い, ポリエチレン細管内の精子をマイクロピペットで吸い取り, 量を計測して, マイクロチューブに入れた。11.5%トレハロース水溶液を精子量の4倍, 9倍または19倍添加し, それぞれ5倍, 10倍, 20倍希釈とした。マイクロピペットを用いて, 希釈した精子を約0.45mL ストロー精液管 (富士平工業株式会社) に注入した。ストローはストローパウダー (富士平工業株式会社) で栓をし, 50mL ガラス試験管に入れた。試験管にアルミ箔で蓋をし, 使用予定日ごとにまとめてキャニスターに入れ, キャニスターをゆっくりと液体窒素を入れた保存容器内 (BIOCANE20, Thermo Scientific, 米国) に下ろし, 液面上3cmで10分間予備凍結後, 液体窒素の中に沈めて保存した。

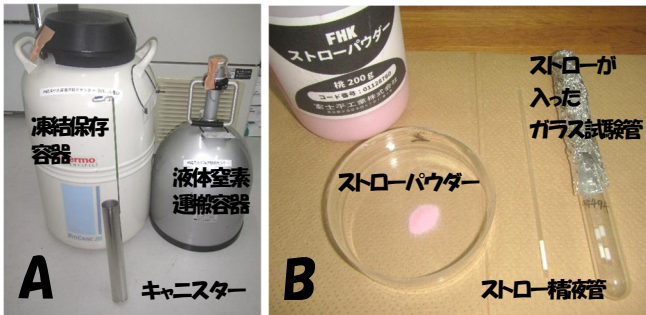


図1 精子凍結の器具

A: 凍結保存容器と液体窒素運搬容器, キャニスター,
B: ストローパウダー, ストロー精液管, ガラス試験管

4月26日に精子の解凍を行った。凍結保存容器から素早くキャニスターを引き上げ, 目的のストローが入った試験管を取り出して流水中へ入れ, すぐにアルミのフタを外して試験管内に水が入るようにした。人工授精に用いる希釈精子の調整は, クロダイ人工精漿 10mL をポリプロピレン製遠沈管に入れ, ストロー1本分の解凍精子 0.4mL を混合して希釈した。希釈精子は, 活性と運動精子密度を測定したのち, 人工授精まで冷蔵庫で保管した。

GnRHa カカオバター注射によって排卵を誘導した養成雌親魚から4月26日に搾出した未受精卵を5mL (平均3.8g) ビーカーに入れ, 希釈精子液を添加してよく混合後, 海水40mLを加えてよく攪拌し, 人工授精した。また, 凍結精子を採取した個体から4月25日に再度精子を採取し, 海水50mLに新鮮精子1滴 (約30~40μL) を添加してよく混ぜたものを用いて人工受精した。人工受精後10分間静置して浮上卵を分離し, 浮上卵と沈下卵の重量から浮上卵率を算出した。砂濾過海水を入れた500mL ビーカーに浮上卵約100個を入れ, 室温で管理し, 約1時間20~30分後に8~16細胞期に発生が進んだ卵の割合を計数し, 受精率とした。

結果及び考察

雄性化処理個体 (MT 投与群) の腹部を指圧したところ, 3尾から精子を採取することができた。そのうち140μL (個体A, 体重7.05kg) と80μL (個体B, 6.05kg) の精子量が得られた2個体の精子について, 凍結保存を行った。

2個体ともに, 新鮮精子では浮上卵率が76.9%, 73.5%と

高い値であったが, 凍結精子では37.5~52.6%と20ポイント以上低い結果となった。個体Aではストロー1本に使用した精子の量が少ないほど浮上卵率は低くなった。また個体Bでは, 精子量が同じで希釈倍率が高い方の浮上卵率が低かった。一方, 受精率は, 凍結精子では78.4~86.5%であり, 新鮮精子の83.5%, 71.2%と同程度か凍結精子の方が高いという結果になった (図2)。今回の結果から凍結保存29日後も精子が受精能力を有していることが確認された。今後, より長期間の保存についても検討する必要がある。

凍結精子の活性は, 新鮮精子と比べて低く, 運動精子密度も2.0~72.1%と新鮮精子よりも低い値で推移した (表1)。ヤイトハタと同属のクエなどでも凍結・解凍後の運動精子密度が凍結前よりも低くなる (今泉ほか, 2005) ことは知られているが, 本種の場合はクエやマハタと比較して, 搾出で得られる精子量が極めて少ないことから, 凍結精子では全ての未受精卵を受精させるために必要な受精能力のある運動精子が足りない可能性が示唆された。最も良かった結果において, 凍結前の精子量40μL (10倍希釈) で5mL (3.8g) の未受精卵から2gの浮上卵を得ていることから, 種苗量産に最低限必要な浮上卵量100gを得るためには, 少なくとも2.0mL以上の精子が必要となる可能性がある。

今後凍結精子を人工授精に用いる場合は, 凍害防御剤や希釈液の再検討とともに, 搾出で得られる精子量を増やす方法の開発が必要である。

表1 雄性化処理個体の新鮮精子と凍結精子の活性, 運動精子密度

個体名	新鮮/凍結	採取年月日	使用精子量 ¹⁾ (希釈倍率)	精子活性 ²⁾ (海水添加前→後)	運動精子密度(%) ²⁾
A	新鮮	2023/4/25	1滴	0→3+	91.0
	凍結	2023/3/28	80μL(5倍)	0→2+	26.0
	"	2023/3/28	40μL(10倍)	0→1+	2.0
	"	2023/3/28	20μL(20倍)	0→2+	16.0
B	新鮮	2023/4/25	1滴	0→3+	89.0
	凍結	2023/3/28	40μL(10倍)	0→2+	8.0
	"	2023/3/28	40μL(20倍)	0→2+	72.1 ³⁾

1) 使用精子量はビーカー1つあたりの受精に用いた量。()はトレハロース溶液の希釈倍率。

2) 新鮮精子は0℃の冷蔵庫で1日保存後, 凍結精子は解凍当日の活性と運動精子密度を示す。

3) 視野内に精子43個のみ確認した。

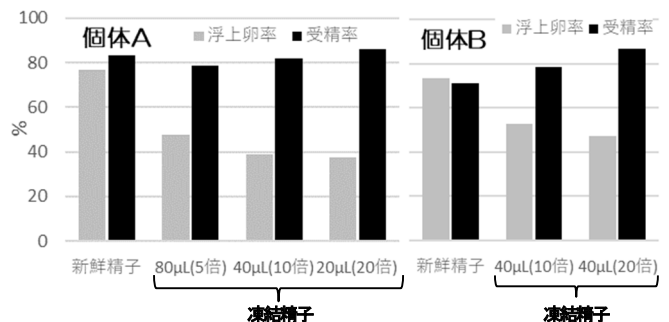


図2 雄性化処理個体の新鮮精子と凍結精子を人工授精に用いた場合の浮上卵率および受精率

1) 凍結精子はストロー管1本の使用精子量。()内はトレハロース溶液の希釈倍率を示す。

文 献

今泉均, 堀田卓朗, 太田博巳. 2005: クエの精子凍結保存方法と凍結精子を用いた人工授精. 水産増殖. 53(4), 405-

411.

太田博巳. 2011 : 魚介類の良質精子作出・保存法の開発に関する研究. 日本水産学会誌. 77(3), 360–363.

渋谷武久. 2016 : リンゲル液で冷蔵保存したホシガレイ精子の活性と受精能. 福島県水産試験場研究報告. 17, 90–95.

宮木廉夫, 山田敏之, 長野直樹, 高見生雄, 門村和志, 土内隼人, 築山陽介, 久保田泰則. 2006 : 凍結保存精子を用いたマハタ人工授精. 長崎県水産試験場研究報告. 32, 17–21.