

マダイ及びクロダイの精子と その凍結保存について

宮木 廉夫

Study on the Spermatozoa of Red Sea Bream, *Pagrus major* and Black Sea Bream, *Acanthopagrus schlegeli* for the Cryopreservation.

Kadoo Miyaki

Various concentrations of sodium citrate, glucose, KCl and NaCl were examined to find optimal conditions for cryopreservation of red sea beam (RSB) and black sea bream (BSB) spermatozoa. The lowest concentrations induced activation of spermatozoa were 0.16 mol (RSB) and 0.10 mol (BSB) for sodium citrate, 0.45 mol (RSB) and 0.35 mol (BSB) for glucose, and 0.25 mol (both species) for KCl and NaCl. Spermocrit value was higher in BSB than in RSB. Cryopreservation of spermatozoa were carried out using 0.06~0.14mol of sodium citrate containing 15% of dimethyl sulfoxide. The optimal concentrations for sperm-cryopreservation were found to be 0.10~0.12 mol for RSB and 0.08 mol for BSB. Thus, we conclude that the concentration of sodium citrate (0.10 mol) which is usually used for cryopreservation of seawater fish spermatozoa are too high for BSB.

魚類の精子凍結保存に関する研究は、1953年に Blaxter¹⁾が凍結保存精子を用いて春ニシンと秋ニシンとの交配を行ったのが最初の試みである。それ以来、数多くの研究者による報告が出されているが、その多くは鮭鱒を主とした特定の魚種を対象とした凍結保存方法の成功例に留まっている²⁾。したがって、今後の研究の展開方法としては凍結保存の技術の改良及び確立は言うまでもなく、その技術の有効性を実証していく必要がある。近年、バイオテクノロジーの導入により、魚類においても育種の短期化が理論上可能になった³⁾。さらにバイオテクノロジーと卵及び精子凍結保存技術とを併用することによって、海産養殖魚の品種改良の発展性が期待される⁴⁾。しかし、海産魚に関しては前述の Blaxter に依る報告があるにも関わらず人工採苗においては人工授精用の精子が比較的容易に採れることから、重視されていないのが現状である。したがって魚種による精子の違いを反映した凍結保存方法の検討は十分になされ

ていない。今回、養殖対象種であるタイ科のマダイ *Pagrus major* 及びクロダイ *Acanthopagrus schlegeli* についてそれぞれに適した凍結保存方法を検討するため、精子濃度と運動性の比較を行い若干の知見を得たので報告する。

材料と方法

実験材料： 採精に用いたマダイとクロダイは、1986年春に当研究所において人工ふ化させ、長崎県西彼杵郡野母湾の網いけす内で養成中のものである。魚体の大きさはそれと同じいけすで養殖されていた同大のマダイとクロダイの各30尾について、1986年4月18日に行った測定値に依って示すと、マダイは平均全長357mm、平均体重790g、クロダイはそれぞれ262mm、408gであった。

精子の採取方法： 採精は海水や尿が混入しないように生殖孔の周りをよく拭き、腹部を軽く圧して生殖孔から出てきた精液を注射器のシリンジを用いて行った。

精子の活力測定法： 採取した精液はその直後にヘマトクリット毛細管を用いてスライドガラスの上に少量のせ、希釈液を加えてよく攪はんしたのち検鏡（×200）した。なお希釈液には、0.06から0.22molまでの9濃度（0.02mol間隔）のクエン酸ナトリウム溶液、0.10から0.55molまでの10濃度（0.05mol間隔）のブドウ糖、塩化ナトリウム及び塩化カリウム溶液を用いた。活力（運動性）の評価は、入谷⁵⁾の報告を参考にして表1に示した基準で行った。

表1 精子の活力（運動性）
Table 1. Motility of spermatozoa

Motility grade	Survival rate of spermatozoa (%)	Movement of spermatozoa
0	0	—
1	< 30	abnormal
2	30-50	slow, straight
3	50-70	moderately active
4	70-80	active
5	> 80	very active

スパマトクリット値： 採取した精液をヘマトクリット毛細管にとり、ヘマトクリット遠心分離装置で10000回転、10分間の遠心分離を行い、精液に占める精子の容積比を求めて百分率で表した。

精子の凍結保存方法： 希釈液にクエン酸ナトリウム溶液、抗凍結剤には Dimethyl sulfoxide を用いた。希釈液の濃度は、マダイで0.10, 0.12, 0.14molの3段階であり、クロダイでは0.06, 0.08, 0.10, 0.12molの4段階とした。精液、希釈液及び抗凍結剤は容量でそれぞれ2:6.5:1.5の割合に混合し、液体窒素中で1~43日間凍結保存を行った。その後、解凍して精子の運動性について観察し活力の判定を前述と同様の方法で行った。

結果と考察

採精は1989年4月25日から同年6月6日までにマダイ33尾とクロダイ30尾から行った。表2に両種のスパマトクリット値の範囲とその平均値を示

表2 マダイとクロダイのスパマトクリット値の比較
Table 2. Comparison of spermatocrit values between red sea bream and black sea bream

Tested fish	Treated fish number	Spermatocrit value		
		Mean	Maximum	Minimum
Red sea bream	33	57.6	90.0	11.0
Black sea bream	30	92.1	99.5	61.0

した。また、図1に供試各個体のスパマトクリット値の変化を示した。これらの結果から、マダイ（平均値57.6）はクロダイ（92.1）と比較して精子濃度が低いことが判る。精子濃度は当養殖場におけるマダイの産卵期（4月~6月）⁶⁾の後期になるにつれて個体差が大きくなっている。この個体差は、当養殖場でマダイとほぼ同じ産卵期を示すクロダイにおいても同様な傾向が見られる。一方、黒倉⁷⁾はクロダイ養殖魚12尾のスパマトクリット値について、平均値で77.0であったとしており、この値と今回得られた値との間に差がみられる。このことは同一魚種であっても飼育環境などの条件に依って精子濃度に差がみられることを示していると思われる。

図2および図3は、マダイとクロダイ精子を9および10段階の濃度のクエン酸ナトリウム及びブドウ糖溶液で希釈したときの活力を調べたもので

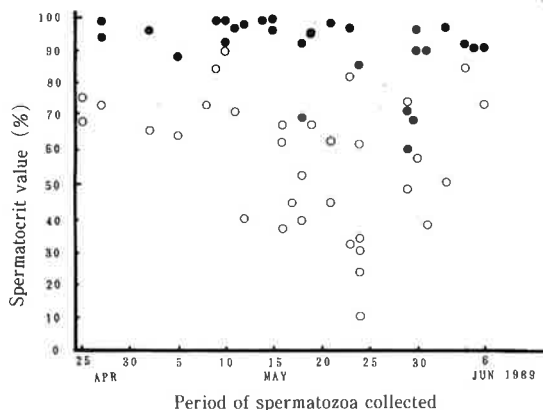


図1 マダイとクロダイのスパマトクリット値の変化
Fig. 1. Changes of spermatocrit values of red sea bream (open circle) and black sea bream (solid circle).

宮木：マダイとクロダイの精子の性質

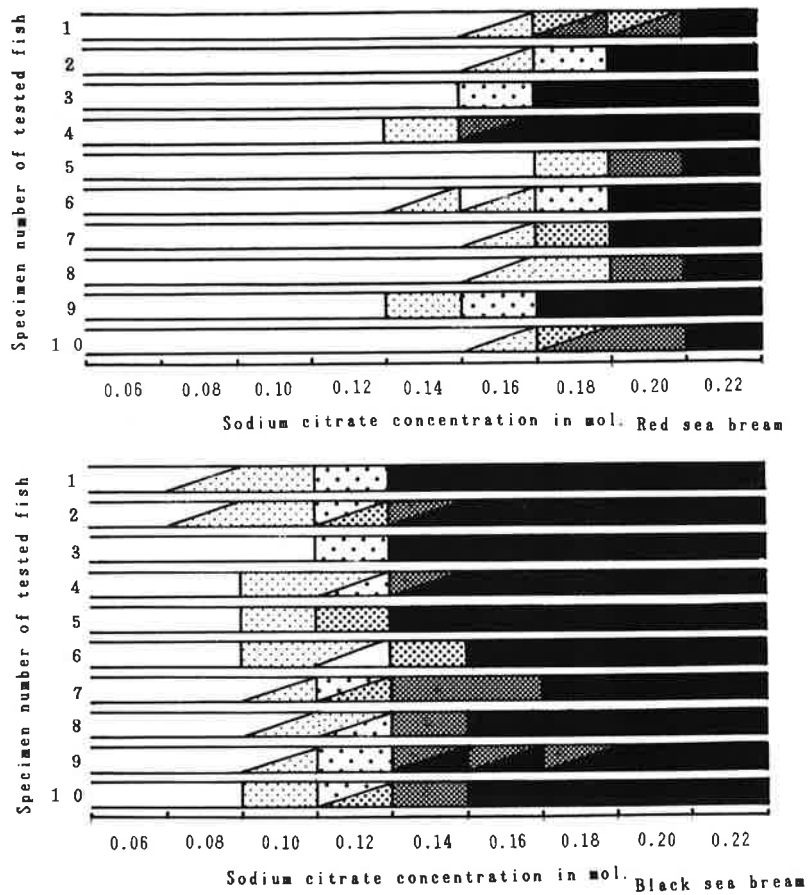
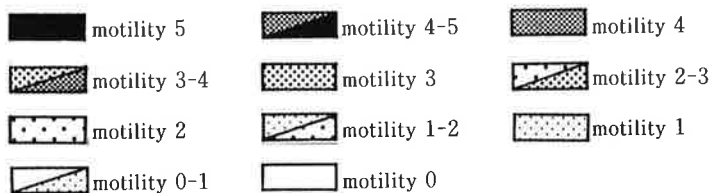


図2 濃度を変えたクエン酸ナトリウム溶液中のマダイとクロダイ精子の活力（運動性）

Fig. 2. Motility of spermatozoa of red and black sea breams in various concentrations of sodium citrate solutions. The motility of spermatozoa was observed in ten fish of each species.



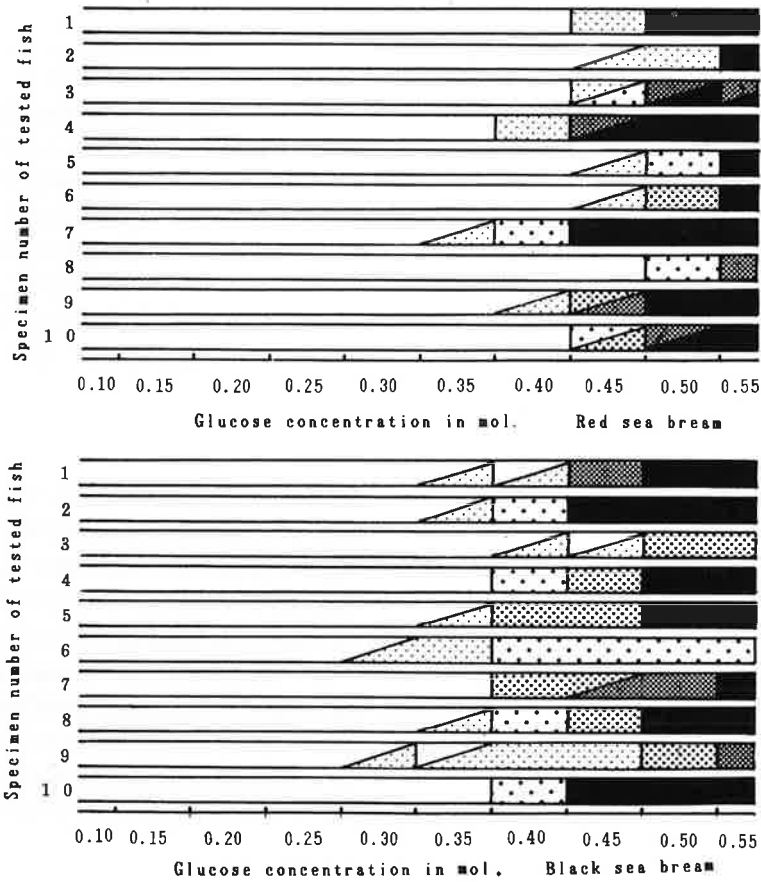


図3 濃度を変えたブドウ糖溶液中のマダイとクロダイ精子の活力(運動性)
 Fig. 3. Motility of spermatozoa of red and black sea breams in various concentrations of glucose solutions. The motility of spermatozoa was observed in ten fish of each species.
 Mortality signs were shown in Fig. 2.

ある。マダイとクロダイの精子の運動が認められた希釈液の最低濃度は、クエン酸ナトリウム溶液では前者が0.16mol前後、後者では0.10mol前後であったのに対して、ブドウ糖溶液では前者が0.45mol、後者では0.35mol前後であった。このことから、マダイ精子はクロダイ精子と比較して運動を開始する希釈液の濃度が若干高い傾向をしめしていることが判る。また、両種の精子の活力は使用した溶液の濃度が一段階上がる毎に徐々に高くなる傾向がみられた。図4および図5は、マ

ダイとクロダイの精子を10段階の濃度のNaClおよびKCl溶液で希釈したときの活力を調べたものである。両種の精子の運動が認められた希釈液の最低濃度は、NaClおよびKCl溶液で両種ともに0.25mol前後であった。しかし両溶液中の精子の活力は溶液の濃度が0.25molから0.30molへ一段階上がると急激に高くなった。これらのことから、両種の精子の運動開始はともに溶液の濃度が0.20molから0.25molの間のごく狭い範囲の濃度で起こることが推察された。なお、これらの精子

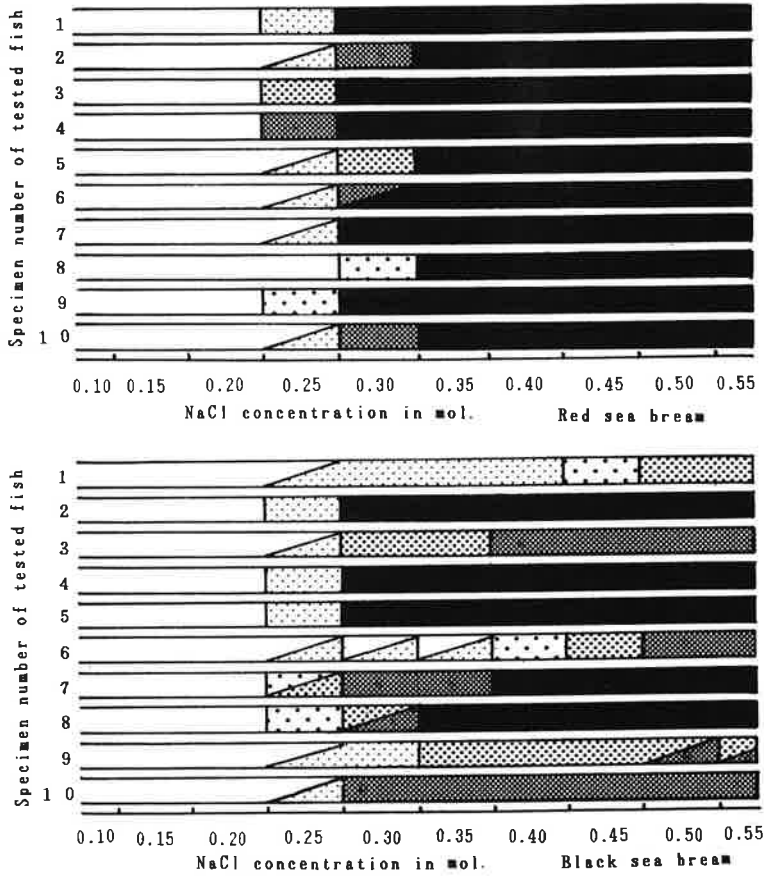


図4 濃度を変えたNaCl溶液中のマダイとクロダイ精子の活力(運動性)
 Fig. 4. Motility of spermatozoa of red and black sea breams in various concentrations of NaCl solution. The motility of spermatozoa was observed in ten fish of each species.

Mortality signs were shown in Fig. 2.

の性質の異同については、それぞれの天然魚についても比較検討し種特有のものであることを確認しておくことが必要である。

海産魚の精子は一般に海水中に放出されて精しょうと海水との浸透圧の差に依って運動を開始するとされていることから⁸⁾、これらの精子の凍結保存を行う場合、凍結前に精子が希釈液の中で運動すると運動エネルギーを失い解凍後の活力が低下するものと考えられる。よって、希釈液は精子の運動を抑える作用を持っている精しょうの浸

透圧(クロダイ:359mOsm⁸⁾)に近いものが望ましい。今までは一般に海産魚の精液の希釈液としては0.10molの濃度のクエン酸ナトリウム溶液が用いられてきた⁹⁾。しかし、今回両種の精子について実験でクロダイ精子は0.10molクエン酸ナトリウム溶液中ではすでに運動を開始していたことから、希釈液としては0.10molより低張のものをを用いた方がよいと考えられる。

今回、マダイとクロダイの精子を濃度の異なったクエン酸ナトリウム溶液を希釈液として凍結保

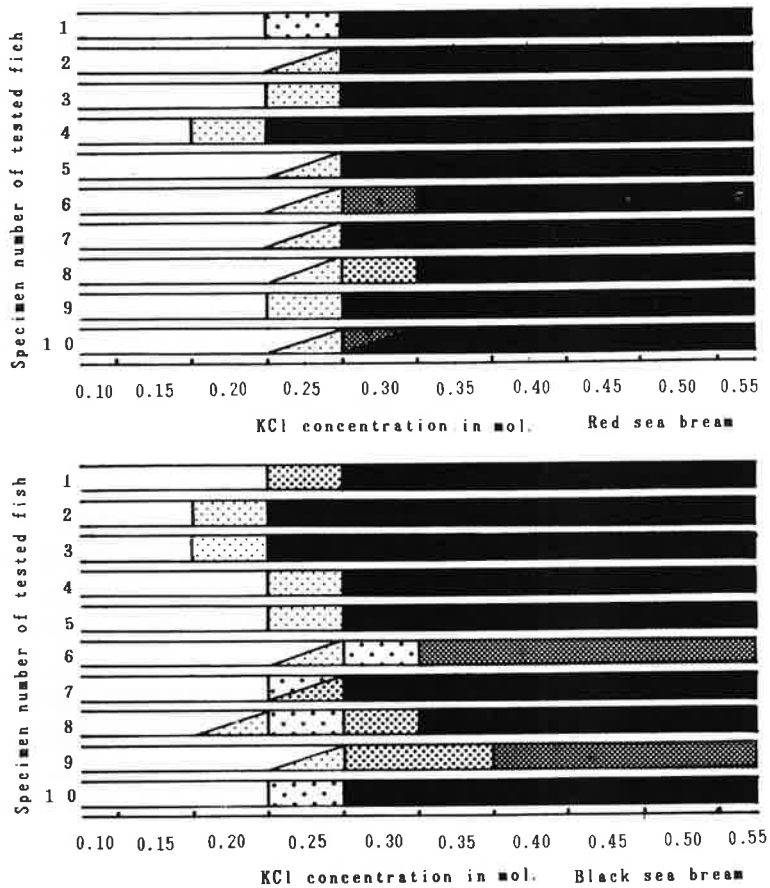


図5 濃度を変えたKCl溶液中のマダイとクロダイ精子の活力(運動性)
 Fig. 5. Motility of spermatozoa of red and black sea breams in various concentrations of KCl solutions. The motility of spermatozoa was observed in ten fish of each species.
 Mortality signs were shown in Fig. 2.

存を行った試験結果を表3に示した。表3からマダイ精子は0.10~0.12mol, クロダイ精子では0.08molのクエン酸ナトリウム溶液を希釈液とした場合において、解凍後に良好な活力を示すことが判る。これら両精子の運動開始状態からみて、前述のように濃度の低いマダイ精子の希釈液としては0.10molのクエン酸ナトリウム溶液が適しており、一方マダイとくらべて濃度が高いクロダイ精子では0.08molがよいことを示していると思われる。このように同科に属する魚種の精子におい

ても、魚種の違いによって精子が運動を開始する濃度に差がみられる。今後は魚種別に精子の活力を指標として、その魚種の精子凍結保存に適した希釈液を調整することに依って海産魚精子の凍結保存技術を高めることが出来ると考えられる。

本論文をまとめるに当たり、種々ご指導ご助言をいただいた長崎大学水産学部名誉教授道津喜衛博士、東京大学農学部附属水産実験所黒倉 寿博士、長崎大学水産学部講師石松 惇博士に深謝の意を表す。

表3 マダイとクロダイ精子の凍結保存の結果

Table 3. Results of sperm-cryopreservation of red sea bream and black sea bream.

Fish name	Number of tested fish	Concentration of extender*1 in mol	Period of preservation (in day)	Motility*2
Red sea bream	1	0.10	8	5
			43	5
		0.12	8	5
			43	5
	0.14	8	8	4-5
			43	5
		20	20	4-5
			32	5
	2	0.12	20	4
			32	5
		0.14	20	3-4
			32	4
3	0.10	10	5	
		10	4-5	
		10	4	
Black sea bream	1	0.08	7	5
			7	4-5
	2	0.08	1	5
			1	4-5
	3	0.08	20	4-5
			20	4-5
	4	0.06	33	2-3
			33	3
		0.10	33	3
			33	2-3

*1 Sodium citrate was used for cryopreservation extender.

*2 Motility was examined after dissolving and motility grades were as same as Table 1.

要 約

1) 濃度の異なったクエン酸ナトリウム、ブドウ糖、NaCl および KCl 溶液を精液希釈液としてマダイとクロダイの精子の活力を評価した。

2) クエン酸ナトリウム溶液中ではマダイ 0.16mol, クロダイ 0.10mol, ブドウ糖溶液中ではマダイ 0.45mol, クロダイ 0.35mol, NaCl と KCl 溶液中では両種ともに 0.25mol で精子が運動を開始した。

3) 精子濃度をマダイとクロダイで比較すると、

スパマトクリット値でクロダイ 92.1, マダイ 57.2 であり前者は後者より高濃度であった。

4) 異なった濃度のクエン酸ナトリウムを希釈液としてマダイとクロダイの精子を凍結保存した結果、前者で 0.10~0.12mol, 後者では 0.08mol の濃度で解凍後に良好な活力を示した。

文 献

1) J. H. S. Blaxter : Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning her-

- ring. Nature 172, 1189-1190 (1953).
- 2) 黒倉 寿：綜説・魚類精液の凍結保存，水産育種，8，17-29 (1983).
 - 3) 小野里 坦：魚類の人為的倍数化とその利用．水産育種，8，17-29 (1983).
 - 4) 宮木廉夫・道津喜衛・松清恵一：海産魚類の凍結保存精子を用いた交配と交配種の養殖に関する研究，長崎先端技術開発協議会昭和58年度助成分先端技術研究成果報告書，25-38 (1984).
 - 5) 入谷 明：精液の性状とその検査，新家畜繁殖学講座Ⅱ．第二版，朝倉書店，東京，1973，pp.51-80.
 - 6) 北島 力：マダいの採卵と稚魚の量産に関する研究，長崎県水産試験場論文集，第5集，1978，pp.92.
 - 7) 黒倉 寿：魚類精液の保存について，遺伝，33，17-22 (1979).
 - 8) 森沢正昭：受精と環境，発生と形態形成，初版，東海大学出版会，東京，1980，pp.51-67.
 - 9) 黒倉 寿：人工受精と配偶子保存，水族繁殖学，初版，緑書房，東京，1989，pp.166-193.