

## 凍結および冷蔵精子を用いたシロアマダイ人工授精

門村和志・築山陽介・濱崎将臣・土内隼人・宮木廉夫

Cryopreservation of *white horsehead*  
*Branchiostegus albus* sperm and  
comparison of fertility of refrigerated and cryopreserved sperm

Kazushi Kadomura, Yousuke Tsukiyama,  
Masaomi Hamasaki, Hayato Donai and Kadoo Miyaki

### Abstract

For artificial fertilization in *white horsehead Branchiostegus albus*, had induced ovulation by gonadotropic hormone injection, cryopreserved sperm were prepared from the live male fish which were caught with the longline in Goto nada, Western kyushu, Japan. Minced testes diluted by three times with 13% trehalose solution were filtered to a nylon net (mesh size 38  $\mu$  m), packed in 0.5 mL polyethylene tubes and preserved in liquid nitrogen ( $-196^{\circ}$  C) for 24 days. The motility of sperm was over 50% after the thawed. Nine female fish were injected with human chorionic gonadotropin (HCG: dose 300-500IU/kg  $\cdot$  Body weight). Eggs were obtained by stripping method, repeated three times (every 24 hours) from the same female fish. Fertilized eggs were obtained from the nine HCG-treated females. The total number of eggs obtained from 24 h to 72 h after HCG injections were 98,600. The ratios of fertilized eggs were shown from 4.8% to 85.3%. The diameter of fertilized eggs showed  $0.97 \pm 0.02$ mm (mean  $\pm$  SD, N=30). The hatching ratio of fertilized eggs was from 69.8 to 94.0%. These results shows that this method is useful for obtain eggs in small catch of fish that as this species.

Key words; *Branchiostegus albus*; Cryopreservation; Sperm; Artificial fertilization

シロアマダイ *Branchiostegus albus* はアマダイ科アマダイ属の一種で我が国沿岸海域では本州中部以南、周辺海域においては釜山から南シナ海にかけて分布する。<sup>1)</sup> 主な漁法は底曳網および底延縄等であるが、その漁獲量は非常に少ない。

長崎県では橘湾から五島灘にかけての海域（水深50～120m）において延縄で漁獲され、アマダイ属の中でも大型で美味であることから高値で取引されている。近年、同属のアカアマダイ *B. japonicus* の種苗生産技術が開発されたことから、<sup>2)</sup>

本種においても栽培漁業対象種として有望視され、人工種苗放流の要望も高い。また本種はアカアマダイより成長が良いことが報告され、<sup>3)</sup> 新しい養殖対象種としても期待される。これまで長崎県総合水産試験場（以下、長崎水試）では、アカアマダイの水揚げ量が多い長崎県対馬市におい

て漁獲活魚を集めて現地にて採卵を行い、得られた受精卵を用いて種苗生産技術の開発を行ってきた。<sup>4)</sup> それに対し本種は、もともと水揚げ尾数が少なく、活きた親魚の入手が困難である。したがって人工授精を行う機会も稀であり、精子の確保、保存技術は本種の種苗生産技術開発を進めるための第一段階と考えられる。アマダイ類の精子保存については、すでにアカアマダイで希釈液にグルコース、抗凍結剤にグリセリンを用いて約2年間凍結保存を行い、それを用いた受精実験が実施されている。<sup>5)</sup> また、延縄の漁獲鮮魚から当日に採取した精巣精子の冷蔵保存方法が検討され、種苗生産現場において実用的に人工授精に使用されている。<sup>2,6)</sup> しかし、筆者らの知る限りシロアマダイの精子保存および人工授精について報告した例はない。そこで2005年および2007年の産卵

期に、シロアマダイ漁獲活魚にHCGを投与して採卵すると同時に2005年には凍結保存精子、2007年には冷蔵保存精子を用いて人工授精を実施した結果、両年共に受精卵が得られ正常にふ化したので、その概要を報告する。

## 材料と方法

**親魚およびHCG投与** 長崎県五島灘において延縄で漁獲され、長崎市みなと漁業協同組合深堀支所（以下、みなと漁協とする）に活魚で水揚げされた親魚（雌雄不明）に、水揚げ現場においてHCG（ゴナトロピン、帝国臓器）を魚体背筋部に300-500IU/kgBWの目安で注射後、直ちに長崎水試にトラックで約1時間かけて運搬した。搬入した親魚については、飼育水温を16℃に調整した3kL循環ろ過水槽内で採卵終了（3日間収容）まで無給餌で飼育した。

**精巣精子の調整** 精巣精子は、前述のように水揚げ直後にHCGを300-500IU/kgBWの目安で投与し、48～72時間生存した雄個体から採取した。魚体から精巣を摘出し、精巣重量を測定後、一部をスライドグラス上で押し潰して精子運動性の有無を顕微鏡下（×200）で確認した。

**精子凍結保存** 精巣精子の凍結保存は既報を参考にして行った。<sup>7)</sup> すなわち、漁獲日が同じ数個体分の精巣を精巣総重量の3倍量の13%トレハロース溶液中でハサミを用いて細切後、ナイロン製メッシュ（目合38 $\mu$ m）で濾し、希釈精子とした。これをマイクロピペットを用いて牛精液保存用0.5mLストロー管（富士平工業）に0.45mLずつ分注し、ストロー管の先端をストロー管パウダー（富士平工業）で閉封後、ガラス試験管を介して液体窒素中に浸漬して凍結保存を行った。精子の解凍は、水道水（流水下14～15℃）を満たしたポリプロピレン製3Lビーカー中に液体窒素中から取り出したストロー管を直接30秒間浸漬して行った。

**精子冷蔵保存** 精巣精子の冷蔵保存は既報に従って実施した。<sup>2,6)</sup> すなわち、精巣を精巣重

量の50倍量のクロダイ用人工精漿中でハサミを用いて細切後、ナイロン製メッシュ（目合38 $\mu$ m）で濾し、希釈精子とした。これを希釈精子量に応じて25cm<sup>2</sup>から175cm<sup>2</sup>の細胞培養用フラスコ（Nunc社およびコーニングジャパン社）に分注し、家庭用冷蔵庫内で保存した。

**保存精子の運動性評価** 保存精子の運動性評価は、冷蔵精子はそのまま、解凍精子はクロダイ用人工精漿で10倍に希釈した後、それぞれ等量の海水を加えて顕微鏡下（X200）で観察し、精液検査標準化ガイドライン<sup>8)</sup>（2003）に準じて精子運動率（%）を算出した。

**人工授精** 採卵は同一雌個体に対してHCG投与24、48および72時間後の計3回、搾出法で行った。なお、72時間後には腹部切開によって卵巣を摘出し、卵巣内に残存する排卵卵を採取した。人工授精は本藤ら（2001）の方法に準じて実施した。凍結精子は解凍後、クロダイ用人工精漿で10倍（0.5mLストロー管2本を解凍してクロダイ用人工精漿10mLに混合：解凍調整精液）に希釈し、顕微鏡下（X200）で運動性を確認した。雌1個体からの搾出卵に対して解凍調整精液または冷蔵精子3mLを添加し混合、海水を加えて20-30分間静置した。その後30Lポリカーボネイト製水槽に収容し浮上卵と沈下卵を分離後、浮上卵のみを1kLアルテミアふ化槽（微通気、微流水で15.5℃に加温調整）に収容した。

受精卵の発生観察は15℃に設定したインキュベーター内に置いた300mLガラス製ビーカーに浮上卵を数百粒収容し、この中から適宜サンプリングすることで実施した。受精率は媒精2-4時間後（2-8細胞期）に浮上卵から約100粒を観察して、観察した全卵数に対する発生卵数の百分率（%）で示した。授精約24時間後には発生卵を1kLアルテミアふ化槽から6kLコンクリート製水槽に移送収容して飼育を行った。水槽内におけるふ化率は夜間の柱状サンプリング（ $\phi$ 40mmの塩ビ管）による容積法で算出した。

## 結果

**親魚** 精子保存および人工採卵試験に供した親魚の性状をTable 1, 2に示した。2005年は2月14日～3月9日に13個体, 2007年は2月19日～3月2日に10個体, 合計23尾を活魚で入手した。性比は雌9個体に対し雄14個体と雄に偏っていた。なお, 2005年3月31日～4月9日のうち3日間で活魚8個体を追加入手したが, すべて雄であった。

**精子運動性** すべての精子はクロダイ人工精漿もしくは13%トレハロース溶液中では運動性を示さず, 海水を添加することで初めて運動を開始した。活魚から採取, 調整した凍結精子を保存22日目に解凍して運動性を観察したところ, 精子運動率は約50%を示し, 運動時間は15分間以上であった。一方, 死亡個体から採取, 調整した凍結精子を保存9日目に同様に解凍して観察したところ, 精子運動率は50%以下で, 頭部を振動させて運動する精子が多く観察された。

**Table 1. Summary of the female fish used in this experiment**

| Individual No. | Date of catch | Total length (mm) | Standard length (mm) | Body weight (g) | Condition factor | Ovarian weight (g) | GSI |
|----------------|---------------|-------------------|----------------------|-----------------|------------------|--------------------|-----|
| 1              | 14-Feb-05     | 370               | 310                  | 600             | 11.8             | 6.7                | 1.1 |
| 2              | 14-Feb-05     | 365               | 290                  | 560             | 11.5             | 14.6               | 2.6 |
| 3              | 09-Mar-05     | 470               | 380                  | 1,320           | 12.7             | 38.4               | 2.9 |
| 4              | 09-Mar-05     | 400               | 328                  | 860             | 13.4             | 15.0               | 1.7 |
| 5              | 09-Mar-05     | 450               | 370                  | 1,190           | 13.1             | 61.9               | 5.2 |
| 6              | 21-Feb-07     | 381               | 334                  | 682             | 12.3             | 22.6               | 3.3 |
| 7              | 21-Feb-07     | 363               | 305                  | 573             | 12.0             | 5.2                | 0.9 |
| 8              | 22-Feb-07     | 336               | 283                  | 584             | 15.4             | 15.3               | 2.6 |
| 9              | 02-Mar-07     | 370               | 322                  | 814             | 16.1             | 12.1               | 1.5 |
| Mean           |               | 389               | 325                  | 798             | 13.5             | 21.3               | 2.4 |

**Table 2. Summary of the male fish used in this experiment**

| Individual No. | Date of catch | Total length (mm) | Standard length (mm) | Body weight (g) | Condition factor | Testicular weight (g) | GSI  |
|----------------|---------------|-------------------|----------------------|-----------------|------------------|-----------------------|------|
| 1              | 14-Feb-05     | 430               | 350                  | 920             | 11.6             | 0.9                   | 0.09 |
| 2              | 14-Feb-05     | 500               | 415                  | 1,750           | 14.0             | 5.6                   | 0.32 |
| 3              | 14-Feb-05     | 465               | 390                  | 1,360           | 13.5             | 3.4                   | 0.25 |
| 4              | 14-Feb-05     | 415               | 340                  | 840             | 11.8             | 0.8                   | 0.09 |
| 5              | 09-Mar-05     | 420               | 340                  | 910             | 12.3             | 1.1                   | 0.12 |
| 6              | 09-Mar-05     | 430               | 350                  | 870             | 10.9             | 0.9                   | 0.10 |
| 7              | 09-Mar-05     | 410               | 338                  | 760             | 11.0             | 0.3                   | 0.04 |
| 8              | 09-Mar-05     | 430               | 350                  | 910             | 11.4             | 1.9                   | 0.20 |
| 9              | 19-Feb-07     | 428               | 342                  | 990             | 12.6             | 1.5                   | 0.16 |
| 10             | 20-Feb-07     | 519               | 429                  | 1,730           | 12.4             | 3.3                   | 0.19 |
| 11             | 21-Feb-07     | 442               | 357                  | 1,260           | 14.6             | 2.9                   | 0.23 |
| 12             | 21-Feb-07     | 475               | 402                  | 1,462           | 13.6             | 4.2                   | 0.29 |
| 13             | 2-Mar-07      | 480               | 392                  | 1362            | 12.3             | 3.6                   | 0.27 |
| 14             | 2-Mar-07      | 400               | 338                  | 857             | 13.4             | 1.3                   | 0.15 |
| Mean           |               | 446               | 367                  | 1,142           | 12.5             | 2.3                   | 0.18 |

**人工授精** HCG投与24, 48, 72時間後の搾出卵量および媒精に使用した精子の保存方法, 保存期間, 受精率をTable 3に示した。

2005年はHCGを投与した5個体すべての雌から卵を得て, 凍結精子を用いた14回の人工授精を行った。No.1, 2およびNo.4の3個体については, 搾出した卵はいずれも形状が歪で, 媒精しても受精しないか, 受精しても受精率は4.8~10.0%と低かった。なお, これらの受精卵はその後発生を停止し胚体形成期まで達しなかった。No.3およびNo.5の2個体からは1個体あたり7,000~16,000粒/日を採卵, 受精率は10.7~57.0%であった。2007年はHCGを投与した4個体すべての雌から卵を得て, 冷蔵精子を用いた11回の人工授精を行った。No.9から24時間後に得た卵だけは受精しなかったが, それを除く10回の人工授精では受精卵が得られ, 受精率は14.7~85.3%であった。

今回, ふ化まで発生を確認した受精卵は, 直径 $0.97 \pm 0.02$ mm (平均値±標準偏差, n=30)の球形で,

直径約0.2mmの油球が1つ認められた。平均卵径は, これまで筆者らが観察したアカアマダイの受精卵 ( $0.89 \pm 0.03$ mm, n=30) よりやや大きかった。

インキュベーター (15°C) で管理した卵の発生は授精後1時間40分で最初の卵割が始まった。同2時間で4細胞期に達して73時間でふ化した。これとは別に直接6kLコンクリート製飼育水槽 (15.6°C) に収容した同腹卵は授精66時間後に既にふ化していた。

2005年に受精卵を収容した水槽では, 収容卵数13,120粒に対し, ふ化仔魚数は12,352尾 (推定ふ化率: 94%), もう1例は収容卵数12,000粒に対し, ふ化仔魚数は8,870尾 (推定ふ化率: 74%) であった。ふ化直後の仔魚の全長は $2.02 \pm 0.03$ mm (平均値±標準偏差, n=7) であった。2007年に受精卵を収容した水槽では, 収容卵数20,000粒に対しふ化仔魚数は13,896尾 (推定ふ化率70%), もう1例は収容卵数12,500粒に対しふ化仔魚数11,000尾 (推定ふ化率88%) であった。

**Table 3. Results of the artificial insemination using cryopreserved or refrigerated spermatozoa of the white horsehead induced ovulation with HCG injection**

| Individual No. | 24hrs after injection |                        | 48hrs after injection |                        | 72hrs after injection |                        | Storage of spermatozoa | Storage period |
|----------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|----------------|
|                | Number of eggs        | Fertilization rate (%) | Number of eggs        | Fertilization rate (%) | Number of eggs        | Fertilization rate (%) |                        |                |
| 1              | little                | 0.0                    | little                | 0.0                    | little                | 0.0                    | cryopreserved          | 1-3days        |
| 2              | little                | 0.0                    | little                | 0.0                    | little                | 10.0                   | cryopreserved          | 2-4days        |
| 3              | 7,000                 | 10.7                   | 7,000                 | 57.0                   | 13,000                | 56.5                   | cryopreserved          | 24-26days      |
| 4              | 2,000                 | 4.8                    | 3,000                 | 0.0                    | dead                  |                        | cryopreserved          | 24-25days      |
| 5              | 9,000                 | 33.3                   | 12,000                | 33.3                   | 16,000                | 38.0                   | cryopreserved          | 24-26days      |
| 6              |                       |                        |                       | 69.4                   |                       | 72.0                   | refrigerated           | 1-3days        |
| 7              | 2300*                 | 39.6*                  | 11,200* <sup>1</sup>  | 46.0                   | 6,500* <sup>2</sup>   | 38.1                   | refrigerated           | 1-3days        |
| 8              | * <sup>1</sup>        | 14.7                   | * <sup>2</sup>        | 68.4                   | 2,100                 | 57.6                   | refrigerated           | 1-3days        |
| 9              | 1,400                 | 0.0                    | 5,100                 | 85.3                   | 6,000                 | 75.0                   | refrigerated           | 0-2days        |

\* The eggs which obtained on the same day were mixed.

### 考察

2005年, 2007年の2~3月に採卵用親魚として入手したシロアマダイ活魚23尾の内訳は, 雌9に対し雄14と性比は雄に偏っていた。さらに2005年の3~4月に追加入手した活魚8尾はすべて雄であった。性比が雄に偏った原因としては季節(産卵期)

や漁場, 漁法による変動のほか, 活魚だけを集めた影響も考えられる。本種を含むアマダイ属3種(シロアマダイ, アカアマダイ, キアマダイ)はいずれも成長に雌雄差があり, 雄の方が大型であることが知られている。Table 1, 2に示したとおり, 今回入手した親魚も, 平均魚体重は雌が798g, 雄が1,142gと雄の方が大型であった。延縄漁獲物を

活魚で扱った場合、その生残率に魚体サイズが影響しており、今回の親魚にみられた性比の偏りはその結果を反映しているのかもしれない。一方で、筆者らが対馬北東海域で行っているアカアマダイの採卵試験においては、受け入れた活魚の63.6% (n=217; 2002年度) は雌であり、また地元延縄漁業者は大型魚になる程、活かすのが難しいとしている。

漁獲時期(水温)、漁場水深が異なるため単純な比較は出来ないが、同じアマダイ属にもかかわらず漁獲活魚の性比や活かしやすさの傾向が正反対であることは興味深い。天然魚を用いて計画的な採卵・種苗生産を行うために、入手可能な親魚の性比を予め把握しておくことは重要であり、今後サンプル数を増して検討する必要がある。

本種精子の凍結保存用希釈液として、長崎水試でクエおよびアカアマダイ等の各種海産魚に用いてきた13%トレハロース溶液<sup>7)</sup>を使用した。この溶液およびクロダイ人工精漿中では精子の運動は認められなかった。このことから、本種精漿の浸透圧はアカアマダイ、クエ等と同等であると判断された。また13%トレハロース溶液による凍結保存精子は操作が簡便であるほか、希釈液中にDMSO等の細胞に毒性を示す物質を含まないため、媒精後の洗卵作業を省略して長く静置できることから、受精率の向上が期待されるなどの利点がある。

シロアマダイ活魚から採取、調整した凍結精子の解凍後の活力は良好で、保存24-26日目の人工授精で最高57.0%の受精率を示した。これに対し、死亡個体から採取、調整した凍結精子を保存9日目に解凍して観察したところ、精子運動率は50%以下で、頭部を振動させて運動するなど、活魚由来の解凍精子と比べて明らかに活力が劣っていた。一方、アカアマダイでは漁獲鮮魚、すなわち死亡個体から抽出した精巢精子の凍結保存を行い、解凍後の活力は良好と報告されている。<sup>9)</sup> アカアマダイの雄(銘柄「特」: 体重1kg以上)は漁獲後直ちに水氷で保存されるが、今回のシロアマダイは水槽内(16℃下)で死亡が確認後に取上

げられるため、死亡後の温度環境の相違が精巢精子の活力に影響しているのかもしれない。シロアマダイの活魚を得る機会は非常に限られていることから、今後はアカアマダイと同様にシロアマダイも漁獲鮮魚からの精巢精子の凍結保存方法を開発する必要がある。

Table 3に示すように、2005年のNo.3およびNo.5からは1日に1万粒以上の比較的多量の受精卵を得ることが出来た。特に48および72時間後に採卵した卵の受精率は2例とも個体ごとに近似していた。このことは、漁獲された親魚ごとに卵質がある程度固定されることを意味しているのかもしれない。2005年に供試した親魚の体重範囲は広く、GSIにも相違が見られるなか、No.3およびNo.5は共に体重1kg以上と魚体が大きく、かつGSIも高い。このような親魚から得た卵の受精率は、他と比べて高い値を示すことは予め想定できる。前述したとおりシロアマダイはもともと漁獲尾数が少なく、活魚を入手する機会は稀であるが、魚体の大きさは親魚を選ぶ指標の1つになる可能性がある。一方、2005年のNo.1およびNo.2, 4の搾出卵は歪な形状を示し、受精率は0-10%と常に低かった。さらに卵発生も胚体形成期に達することなく途中で停止した。これら親魚の肥満度やGSIは平均より低い傾向にあり、卵の形状が歪なことや、親魚が死亡する直前の卵であることなどから、受精率が常に低かった原因は卵質にあると考えられる。2007年の採卵結果も同様に、48および72時間後の卵の受精率は個体ごとに高い受精率を示した親魚の魚体重や肥満度は平均より高めであった。

人工授精試験により得られた受精卵の一部は卵管理後、飼育水槽へ収容し、飼育を試みた。採卵数が少量であったため、複数ロットの受精卵をまとめて収容したが、夜間の柱状サンプリングによる推定ふ化仔魚数は、収容卵数と受精率から推定される予定ふ化尾数とほぼ一致することから、受精卵の大部分は正常にふ化したものと推察された。

以上のことから本種の精巢精子を13%トレハロースで希釈後、液体窒素中で凍結することで少

なくとも24日間は受精能力を保持した状態で保存可能で、受精卵は正常にふ化することが明らかになった。ただし、受精率が低い原因については、卵質や保存による影響なども考えられる。この点については、今回、新鮮精子との比較を行ってないことから、今後の検討課題としたい。

筆者らが長崎県対馬市で行っているアカアマダイの採卵においては、地元延縄漁業者の協力により約1週間で数百尾の親魚を確保できる。一方、シロアマダイはもともと漁獲尾数が少なく、十分な親魚の確保が困難である。本種の種苗生産技術開発を進めるにあたり、今回の精子保存技術の開発により雄の入手については時間的制約がなくなった。残された課題として雌の確保があり、種苗生産の成否は活魚雌の入手尾数に依存するものと考えられることから、今後は養成親魚からの成熟採卵方法についても検討する必要がある。

## 謝辞

シロアマダイ親魚の入手に協力して頂いた長崎市みなと漁業協同組合の関係各位に厚くお礼を申し上げます。

## 文献

- 1) 荒賀忠一:アマダイ科. 日本産魚類大図鑑 (益田一・尼岡邦夫・荒賀忠一・上野輝彌・吉野哲夫編), 東海大学出版会, 東京, pp. 147 (1992).
- 2) 本藤 靖・村上直人・渡辺 税・竹内宏行・藤浪祐一郎・津崎龍雄:人工授精によるアカアマダイの種苗生産. 栽培技研, 28 (2), 73-79 (2001).
- 3) 林 泰行・高木和昭・尾串好隆:東シナ海産シロアマダイの生態学的研究. 山口外海水試研報, (22), 20-29 (1986).
- 4) 宮木廉夫. 長崎県におけるアカアマダイの種苗量産技術開発について. 豊かな海, 2, 30-32 (2004).
- 5) 奥村重信・廣瀬慶二:凍結保存精子によるアカアマダイの人工授精. 水産増殖, 39 (4),

441-446 (1991).

- 6) 藤浪祐一郎・竹内宏行・津崎龍雄・太田博己:アカアマダイ漁獲鮮魚から採取した精巢精子の運動活性と冷蔵保存. 日水誌, 69 (2), 162-169 (2003).
- 7) MIYAKI, K., S. NAKANO, H. OHTA and H. KUROKURA: Cryopreservation of kelp grouper, *Epinephelus moara*, sperm using only a trehalose solution. *Fisheries Sci.*, 71, 458-459 (2005).
- 8) 日本泌尿器科学会: 精液検査標準化ガイドライン (精液検査標準化ガイドライン作成ワーキンググループ編), 金原出版株式会社, 東京, p33 (2003).