

## 凍結保存精子を用いたマハタ人工授精

宮木 廉夫, 山田 敏之, 長野 直樹\*<sup>1</sup>, 高見 生雄  
門村 和志, 土内 隼人, 築山 陽介, 久保田泰則\*<sup>2</sup>

### Artificial Insemination Method of Sevenband Grouper *Epinephelus septemfasciatus* Using Cryopreserved Sperm

Kadoo Miyaki, Toshiyuki Yamada, Naoki Nagano\*<sup>1</sup>,  
Ikuo Takami, Kazushi Kadomura, Hayato Donai,  
Yousuke Tsukiyama and Yasunori Kubota\*<sup>2</sup>

To prevent infection from nervous necrosis virus (NNV), artificial insemination of sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus* was attempted using the cryopreserved spermatozoa that showed no presence of NNV through nested-polymerase chain reaction (PCR) test.

The sperm were collected with stripping method from 33 males, diluted with extender solution (only 13% trehalose, dissolved in distilled water), packed in polyethylene tubes and preserved in liquid nitrogen (-196°C) from 4 to 730 days between 2003 and 2005 the years. The motility of spermatozoa was over 50% after the preservation period. Fertilized eggs were obtained from 23 luteinizing-hormone-releasing-hormone-analog (LHRHa)-treated females in the same experimental years (2003-2005). The ratios of fertilized eggs obtained were ranged from 25% to 98%.

マハタ *Epinephelus septemfasciatus* は、ハタ科マハタ属の一種でわが国では琉球列島を除く北海道南部以南から東シナ海に分布する<sup>1)</sup>。本種は成長すると90cmに達する大型魚で、非常に美味であることから同属のクエ *E. bruneus* と同様に増養殖対象魚種として、近年西日本各地の試験研究機関で種苗生産研究が行われている<sup>2)</sup>。ハタ科魚類は、一般に、雌性先熟であることが知られているが<sup>3)</sup>、本種においても親魚養成年数が経過すると共に雌から雄に性が転換することが知られている。従って大型個体は雄であることが多く、成熟した雄個体を養成するには多大な時間と労力及び経費がかかる。そのため、

人工授精の際に使用できる十分量の精子の確保が課題となっており<sup>4)</sup>、その解決のために、従来より雌個体に雄性ホルモンを投与することによる性転換が試みられ、マハタ及びクエの雄性化については既に幾つか報告がある<sup>4-6)</sup>。

一方、これまでハタ類は異体類のマツカワ *Verasper moseri* 等と同様に種苗生産初期にウイルス性神経壊死症 (VNN) による大量死が発生し、防除対策が課題とされていた<sup>7,8)</sup>。近年ではその一策として雌雄親魚を原因ウイルス遺伝子のPCR増幅による検出方法で陰性個体を選択し、採卵に供することが有効とされている。そこでウイルス検査済みの精

\*<sup>1</sup> (財) 長崎県産業振興財団コア研究室

\*<sup>2</sup> (株) 長崎県漁業公社

子を予め準備しておくことは、ウイルス防除対策に有効であるほか、人工授精作業の効率化が図られる。

ハタ類の精子凍結保存については、これまで同属のクエ *E. bruneus* については解凍精子を用いた人工授精が行われている<sup>\*3,9,10)</sup>。また、ヒトミハタ *E. tauvinan* では、解凍後の精子運動性が確認されている<sup>11)</sup>。マハタについては解凍後の活力判定やビーカー内による受精実験によって約22万粒の受精卵が得られているが、これを用いた飼育経過等については報告されていない<sup>12,13)</sup>。

著者らは、2003～2005年において、マハタのウイルス検査済み（陰性）精子を13%トレハロース水溶液で希釈後、液体窒素中で凍結保存を行い、4～730日間保存した精子を用いて人工授精を実施した結果、高い受精率が得られ、これらの受精卵を種苗生産に供することが出来たので報告する。

## 材料と方法

**親魚および採精** 採精は主として1991年および1992年に長崎市野母崎町の長崎県水産試験場増養殖研究所（現長崎県総合水産試験場）において生産し、水試沖の筏（網生簀）で養成されていた個体群から行った。精子の採取は海面筏上で、タモ網で1個体ずつ掬い、ビニール袋（1m×1m×1m）に入れ、予め魚体内部に装着しておいたピットタグの番号を読み取り、全長、体長及び体重を測定後、腹部を押して生殖孔から出る精液を5mlシリンジを用いて吸入することで行った。

**ウイルス検査** 採取した精液は個体毎に100～500 $\mu$ lを500 $\mu$ lアンプルに分注し、定法である nested-PCR 法によってロット毎の検査を実施した。

**精子凍結保存** 精子の凍結保存は2003～2005年の本種の産卵初期に、Miyaki et al<sup>9)</sup>の方法に準じて行った。即ち、新鮮精子容量1に対して13%トレハロース（商品名：トレハ、(株)林原商事、岡山）水溶液を容量2の割合で混合後、マイクロピペットを用い

て0.5mlストロー管（富士平工業（株）、東京）に0.45ml注入し、ストロー管の先端をストロー管パウダー（富士平工業（株）、東京）で閉封した。次に試験管内にストロー管を4～8本ずつ収容して試験管の口部をアルミ箔で蓋い、これを直ちに液体窒素中（-196℃）に浸漬した。

**採卵と人工授精法** 採卵試験は2003～2005年の3ヵ年実施した。2003年は総合水試地先の海面生簀で養成した雌親魚から現場（海面筏上）で採卵した。2004年及び2005年には同屋内にある陸上水槽100klで養成した雌親魚、更に2005年の一部については佐世保市小佐々町にある（株）長崎県漁業公社の屋内陸上水槽30klで養成した雌親魚を用いて、現地で採卵試験を実施した。

採卵は、各年5月中旬に養成雌親魚からカニューラによる卵巣卵の採取を行い、卵母細胞径が450 $\mu$ m程度に成長した個体に対して卵巣組織の nested-PCR 法によるウイルス検査と魚体背筋部へ LHRHa コレステロールペレットを挿入することで排卵を促進することで行った。人工受精は乾導法で行い、これに用いる調整精子は本藤ら<sup>14)</sup>の方法を参考にしてクロダイ人工精漿（組成；NaHCO<sub>3</sub>:1.680g, NaCl:7.889g, KCl:0.149g, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O:0.468g, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O:0.206g, HEPES:4.677g-NaOH, pH 8.2/蒸留水 1l 中)10mlにストロー管1本分の解凍精子0.45mlを混合して作製した。添加調整精子量は基本的には15mlとし、採卵量の多少によって6～22mlと添加量を調整した。採卵は搾出法によってボウルに回収し、直ちに調整精子を添加しよく混合後、殺菌海水を加えてよく攪拌して10分間放置することで授精作業を完了した。その後、1個体分ずつ洗卵を行い30l円形ポリカーボネイト水槽に収容して浮上卵と沈下卵に分けて各々の卵数を計数した。受精率については、媒精約2時間後の4～8細胞期に浮上卵を約100個観察して観察全卵数に対する発生卵数の百分率で表わした。

\*3 宮木廉夫・塚島康生・立原一憲・荒川敏久. クエ精子凍結保存について. 平成2年度日本水産学会秋季大会講演要旨集 417.

## 結果と考察

**VNNウイルス検査** Table 1 に2005年5月9日および6月2日に実施した精子凍結保存およびウイルス検査 (nested-PCR) 結果を示した。過去2年 (2003年及び2004年) においては、共に5月に各々6個体および9個体から採精及び凍結保存し、nested-PCR検査を実施した結果は、すべて陰性であった。2005年5月9日に同一親魚群中の10個体から採精及び凍結保存を行い、ウイルス検査を実施した結果、うち3個体で陽性と診断された。さらに2005年6月2日に同一親魚群の8個体について採精および凍結保存し、検査を実施したところ、同年5月9日に陽性と診断された同一個体で再び陽性と診断された。

これまで過去2年間のウイルス検査および著者の知る限りでの長崎水試におけるマハタ雄精子のウイルス検査ではすべて陰性であったが、2005年に初めて陽性個体が検出された。これについては、基本的には検査技術の進歩および高齢化に伴う魚体のウイルス感染に対する抵抗力の低下によるものと推察された。

**凍結保存** 13%トレハロース水溶液中ではマハタ精子は運動性を示さなかった。解凍した精子を更にクロダイ人工精漿で22倍に希釈後の調整精子の運動性はそのままでは0%で、海水を添加すると顕微鏡下

( $\times 200$ ) で視野中で約50%の精子が前進運動を開始し、10分以上継続した。なお、今回は保存期間が4~730日と期間に長短がみられたが、解凍後の精子運動比 (運動性) と保存期間との間に明らかな相関が認められず、解凍精子は全てほぼ50%の精子に前進運動が認められた。今後はさらに長期間に亘って保存した精子についても検討したい。

**採卵と人工授精法** Table 2 には2005年に実施した凍結保存精子による人工授精結果を示した。受精卵は5月13日~6月9日に計14尾から得られており、媒精に用いた精子の凍結保存期間は前述のように最短で4日間、最長で730日間であった。雌1個体 (採卵数: 6.0~215.2万粒) に用いた調整精子量は約15 ml (6~22ml) で、0.5mlストロー管1.5本分: 生精子換算0.68mlであった。これに対して受精率は40.0~98.0%であったが、精子凍結保存期間との相関は認められず、730日間凍結保存した精子を用いても90.5%の受精率が得られた。

同様に2003年 (雌3個体) および2004年 (雌9個体) において各々1個体分の搾出卵に対して0.5mlストロー管1~2本分の解凍精子を媒精することで、25.5~93.8%の受精率 (2003年: 雌3個体の平均受精率78.9%, 2004年: 雌9個体の平均受精率54.0%) が得られた。このように本人工授精法を用いれば雌1個体に対して人工授精に必要な凍結精子の量

Table 1. Data of cryopreservation of spermatozoa in 2005, size of male fish, date of preservation and results of virus infection test

| Date of sperm Cryopreservation | Fish. Number | Tag Number | Total length (mm) | Standard length (mm) | Body weight (kg) | Vol. of sperm obtained (ml) | Result of virus test (positive (+) negative(-)) |
|--------------------------------|--------------|------------|-------------------|----------------------|------------------|-----------------------------|---|
| 9-May                          | 1            | 2531C      | 815               | 680                  | 10.5             | 1.8                         | -   |
|                                | 2            | F2868      | 830               | 700                  | 9.1              | 2.5                         | +   |
|                                | 3            | 1277A      | 850               | 720                  | 11.0             | 2.4                         | -   |
|                                | 4            | C5322      | 835               | 710                  | 10.4             | 3.4                         | -   |
|                                | 5            | 70654      | 840               | 720                  | 8.8              | 3.0                         | +   |
|                                | 6            | 4470A      | 790               | 680                  | 8.9              | 1.2                         | -   |
|                                | 7            | 13D7F      | 815               | 680                  | 9.8              | 2.2                         | +   |
|                                | 8            | 05919      | 760               | 650                  | 8.3              | 1.4                         | -   |
|                                | 9            | 32F41      | 770               | 660                  | 8.0              | 2.8                         | -   |
|                                | 10           | C526D      | 815               | 670                  | 8.9              | 2.6                         | -   |
| 2-Jun                          | 1            | 30700      | 800               | 690                  | 8.3              | 4.0                         | -   |
|                                | 2            | 1714D      | 720               | 615                  | 6.7              | 2.0                         | -   |
|                                | 3            | 54E0C      | 710               | 620                  | 8.7              | 1.5                         | -   |
|                                | 4            | 13D7F      | 830               | 720                  | 10.0             | 1.5                         | +   |
|                                | 5            | C5322      | 815               | 690                  | 10.5             | 6.0                         | -   |
|                                | 6            | 1277A      | 860               | 700                  | 10.9             | 2.4                         | -   |
|                                | 7            | B2101      | 720               | 620                  | 6.7              | 2.1                         | -   |
|                                | 8            | 2531C      | 840               | 720                  | 10.7             | 2.2                         | -   |

Table 2. Results of artificial fertilization using cryopreserved sevenband grouper sperm

| Date of fertilization | Addition of diluted sperm (ml) | Preserved periods (days) | Total length (mm) | Standard length (mm) | Body weight (kg) | Fertilized rate(%) | Number of obtained eggs(10 <sup>4</sup> ) | Number of floated eggs(10 <sup>4</sup> ) | Buoyancy rate(%) |
|-----------------------|--------------------------------|--------------------------|-------------------|----------------------|------------------|--------------------|---|--|------------------|
| 25-May                | 15                             | 365                      | 71                | 58                   | 7.3              | 68.2               | 19.4                                      | 13.2                                     | 68.0             |
| 27-May                | 15                             | 730                      | 64                | 54                   | 5.2              | 90.0               | 31.9                                      | 18.1                                     | 56.7             |
| 13-May                | 6                              |                          | 60.5              | 50                   | 4.3              | 49.1               | 46.3                                      | 39.6                                     | 85.5             |
|                       | 17                             | 4                        | 67                | 56                   | 7.3              | 55.4               | 137.3                                     | 134.2                                    | 97.7             |
|                       | 22                             |                          | 71                | 60                   | 7.5              | 67.1               | 215.2                                     | 212.3                                    | 98.7             |
|                       | 12                             |                          | 66                | 54                   | 5.3              | 91.9               | 35.6                                      | 35.2                                     | 98.9             |
| 18-May                | 15                             |                          | 69                | 59                   | 5.2              | 40.0               | 82.9                                      | 80.7                                     | 97.3             |
|                       | 10                             |                          | 60                | 57                   | 5.6              | 67.0               | 6.0                                       | 6.0                                      | 100.0            |
|                       | 20                             | 9                        | 88                | 76                   | 13.5             | 94.0               | 111.3                                     | 106.0                                    | 95.2             |
|                       | 15                             |                          | 65                | 55.5                 | 5.1              | 88.0               | 99.3                                      | 97.5                                     | 98.2             |
|                       | 15                             |                          | 72                | 62                   | 7.2              | 98.0               | 105.3                                     | 104.0                                    | 98.8             |
|                       | 15                             |                          | 68                | 57.5                 | 6.4              | 96.0               | 66.8                                      | 65.0                                     | 97.3             |
| 8-Jun                 | 15                             | 6                        | 70                | 58                   | 6.6              | 95.8               | 22.4                                      | 22.3                                     | 99.6             |
| 9-Jun                 | 16                             | 7                        | 62                | 53                   | 5.0              | 40.0               | 31.5                                      | 25.8                                     | 81.9             |

は、0.5mlストロー管1-2本あれば十分であると判断された。

今回実施した人工授精手法では、媒精後精子が卵に接触する時間が長いため、精子凍結保存期間と受精率の関係には、精子の運動比（運動性）がある程度維持されていれば、その高低よりも卵質の良否が強く影響を与えていると推察された。これらのことからマハタ精子は13%トレハロース水溶液を用いて凍結保存することで2年間は十分に使用できることが推察された。さらに継続して長期間凍結保存を行い、有効保存期間を明らかにする必要があるが、2003年における精子凍結保存期間は10日間、2004年は8-14日間と例年は10日前後であった。これはウイルス防除として例年産卵期初期に精子の凍結保存（10日間）とウイルス検査を実施しておくことで、その年の人工授精時に新たな精子（ウイルス検査陰性）が供給可能で有効な手法の一つと思われた。

## 謝 辞

本稿をまとめるにあたり、貴重なご助言を賜るとともに、ご高閣下さいました東京大学大学院農学生命科学研究科教授の黒倉寿教授に心からお礼申し上げます。

なお、本研究は長崎県地域結集型共同研究事業

「ミクロ海洋生物による海洋環境保全・生物生産に関する技術開発」により行われた。ここに記して謝意を表する。

## 文 献

- 1) 瀬能宏. ハタ科. 中坊徹次 (編), pp. 690-731. 日本産魚類検索-全種の同定, 第二版, 東海大学出版会, 東京, (2000).
- 2) 水産庁・(社)日本栽培漁業協会編. 平成13年度栽培漁業種苗生産, 入手・放流実績 (全国). 35, (2003).
- 3) Kuo CM, Ting YY, Yeh SL. Induced sex reversal and spawning of the blue-spotted grouper, *Epinephelus fario*. *Aquaculture*; 74:113-126 (1988).
- 4) 塚島康生, 北島 力. メチルテストステロン経口投与によるマハタの雄性化の促進. 長崎水試研報, 9, 55-57(1983).
- 5) 塚島康生, 吉田範秋. メチルテストステロン経口投与によるクエの雄性化の促進. 長崎水試研報, 10, 101-102(1984).
- 6) 土橋靖史, 田中秀樹, 黒宮香美, 柏木正章, 吉岡基. マハタ雄性化のためのホルモン投与法の検討. *SUISANZOSHOKU*, 51, 189-196 (2003).
- 7) 渡辺研一. マツカワに発生したウイルス性神経

- 壊死症の防除に関する研究. (社) 日本栽培漁業協会特別研究報告15号, 1-71 (2000).
- 8) 土橋靖史, 栗山 功, 黒宮香美, 柏木正章, 吉岡基. マハタ種苗生産におけるウイルス性神経壊死症 (VNN) の防除対策の検討. 水産増殖, 50, 355-361 (2002).
- 9) Miyaki, K., S. Nakano, H. Ohta and H. Kurokura. Cryopreservation of kelp grouper *Epinephelus moara* sperm using only a trehalose solution. *Fish. Sci.* 71, 457-458 (2005).
- 10) 今泉 均, 堀田卓朗, 太田博巳. クエの精子凍結保存方法と凍結精子を用いた人工受精. 水産増殖, 53, 405-411 (2005).
- 11) Withler, F. C. and Lim, L. C.. Preliminary observations of chilled and deep-frozen storage of grouper (*Epinephelus tauvua*) sperm. *Aquaculture*, 27, 389-392 (1982).
- 12) 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別刷, 25-38 (1984).
- 13) 本原 稔, 吉武政広, 篠原孝司. 凍結保存精子を用いたマハタ種苗生産. 養殖, 2, 74-76 (1997).
- 14) 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, 73-79 (2001).