

ニゴロブナ精液の凍結保存の検討

藤岡 康弘

Cryopreservation of Spermatozoa of Nigrobona
Carassius auratus grandoculis

Yasuhiro Fujioka

Cryopreservation of nigrobona sperm was attempted. The sperm diluted with extender and DMSO was packed straw tubes, and put into a glass tube. Freezing was carried out by immersing a glass tube in a methanol-dry ice bath for 16 min. After preserving for 3 weeks in liquid nitrogen, the preserved sperm was fertilized with eggs for estimation of fertilizing capacity. Eggs fertilized with preserved sperm showed 42% eying and 40% hatching, comparing with 97% and 79%, respectively, in control. Survival of the fry hatched from eggs fertilized with preserved sperm showed 92% for 2 weeks. No difference in the survival and deformed rate of hatched fry was observed between the preserved sperm and fresh sperm.

魚類精液の保存に関する研究の歴史は比較的古く、これまでサケ科魚類や海産魚を中心として研究が進められてきた。^{1,2)} 魚類精液保存の目的について黒倉¹⁾は、1. 特定の形質を持った親魚の精液のより有効な利用を可能にする。2. 時間・空間的に離れた雌雄間での交配を可能にする。3. 天然からの採捕によって親魚を入手する場合、雌雄親魚を同時に採捕する必要をなくす。4. 雌雄親魚の成熟期に違いのある魚種の種苗生産で行われている人工的な成熟制御・促進等の必要性をなくす。の4点を掲げており、魚類精液の保存技術の開発が種苗生産技術の効率化ばかりではなく育種技術の発展に重要な役割を果たすことを指摘している。

最近の魚類における雌性発生技術の開発により全雌生産やクローンの作出が可能となり、今後この技術は魚類育種において重要な役割の一端を演じるものと考えられる。全雌生産における偽雄精子を大量に保存することや優良な形質のクローン保存において長期の精液保存は極めて有効な手段になるものと考えられる。

現在著者らはフナ属魚類の内、琵琶湖に生息するニゴロブナの全雌生産技術の開発やクローン作出に取り組んでいるが、上述のような理由から、平行してニゴロブナ精液の保存技術について若干の検討を行ったので、その結果について報告する。

材料および方法

実験に使用したニゴロブナ Carassius auratus grandoculisは、滋賀県水産試験場で人工飼育した3年魚の雄10尾で、5尾ずつ2組に分けて精液を採取し、それぞれ10ml容積のキャップ付きガラス瓶に一時保存した。

精液の凍結保存はKurokura et al.³⁾の方法に従って2段階凍結法により実施した。すなわち、精液は直ちにDMSOの入った希釈液と混合し、0.5ml用の牛精液保存用ストロー管に封入した。希釈液はTable 1に示すように、淡水硬骨魚類用生理食塩水(pH7.0に調整)のExtender AとKurokura et al.³⁾によるExtender Bである。精液：希釈液：DMSOの混合比は2：7：1の割合で行った。精液の封入したストロー管5本を口径16mmのガラス試験管に入れてコルク栓をし、メタノール・ドライアイス中に16分間入れて予備凍結の後、液体窒素中でさらに温度を下げて保存した。メタノール・ドライアイス中の凍結時のストロー管内の希釈精液の温度変化を

Table 1. Chemical compositions of the extenders

Extender	Concentration (mg)					
	NaCl	KCl	CaCl ₂	NaHCO ₃	MgCl ₂	H ₂ O *
Extender A	750	20	20	2	0	100 ml
Extender B	440	620	22	20	8	100 ml

* Distilled water.

Extender Bの希釈精液について測定した。精液の採取と凍結保存は1988年7月7日に実施した。凍結保存後3週間が経過した7月28日にニゴロブナの雌1尾(3年魚)から人工的に採卵し(日本薬局方胎盤性性腺刺激ホルモン:ゴナトロピン1000,帝国臓器製薬株式会社製を採卵の約10時間前に腹腔内に注射した。)、0.5gの卵にストロー管1本の保存精液を受精した。なお、凍結保存精液は、液体窒素中から取り出し直ちに20℃の地下水中で溶解して使用した。受精した卵は水中でスリガラス板に付着させ、室温で培養して2日後に発眼率を調査した。さらに、受精後4日目に孵化率および孵化仔魚の中の奇形魚の割合を求めた。また、孵化仔魚各80尾を20ℓの円形パンライト水槽に放養し、ワムシおよびミジンコ幼生を与えて14日間飼育し生存率を比較した。

結 果

メタノール・ドライアイス中の希釈精液(Extender Bを使用)の温度変化をFig. 1に示した。ストロー管内の希釈精液はメタノール・ドライアイスに投入

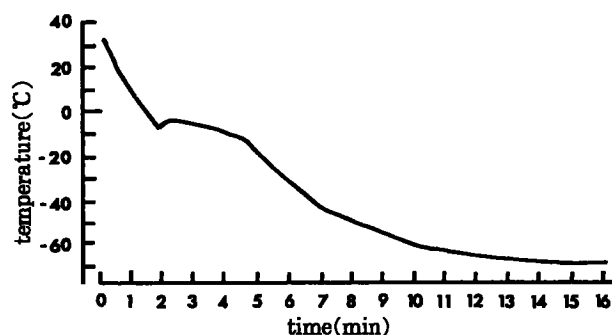


Fig. 1 Freezing curve of the sperm diluted with Extender B and DMSO in the straw tube.

後1分51秒まで急激に温度が低下し-7.5℃となった。その直後に氷晶の形成と潜熱の放出により希釈精液温度は3℃上昇し-4.5℃となった(凍結開始2分後)が、その後は徐々に温度が低下し凍結開始後15分に-69℃でほぼ平行状態となった。以上の結果から予備凍結における希釈精液の凍結速度は-6.7℃/minであった。なお、予備的に行ったExtender Aを用いた希釈精液のメタノール・ドライアイス中での温度変化は、凍結開始1分20秒まで急激に低下して-3.0℃となり、その後3℃上昇して後さらに低下しExtender Bの場合と若干異なっていた。

凍結保存精液を受精した卵の発眼率および孵化成績を一括してTable 2に示した。希釈液として用いたExtender AおよびExtender Bとも発眼率は40%前後の値(平均41.7)を示し大差は認められなかったが、対象区の97.1%に比較してかなり低い値となった。また、発眼した卵のほとんどが孵化したことから孵化率も平均40%と差は見られなかったが、対象区の79.4%の半分の値であった。孵化仔魚の奇形率はExtender Aの2で6.6%と若干高い値を示したものの、その他は対象区と大きな差はなかった。

孵化後2週間の生存率は、凍結保存精液で86.3%~95.0%(平均91.9%)と対象区の88.8%との間に差はなかった。

考 察

以上の実験結果により、液体窒素中で3週間保存したニゴロブナ精液を用いて約40%の孵化率を得ることが明らかになった。また、凍結保存精液を用いて孵化した仔魚の生存率および奇形の出現率は対象区と差のないことも判明した。Kurokura *et al.*³⁾はニシキゴイの精液を用いて今回と同様の凍結方法

Table 2. Number of eying and hatching of the eggs fertilized with preserved sperm,

Extender	Sperm (batch no.)	Eggs no.	Eyed eggs (%)	Hatched fry (%)	Deformed fry ^{*1} (%)
Extender A	1	496	226 (45.6)	198 (39.9)	5 (2.5)
	2	550	229 (41.6)	226 (41.1)	15 (6.6)
Extender B	1	381	163 (42.8)	163 (42.8)	4 (2.5)
	2	270	99 (36.7)	98 (36.3)	1 (1.0)
Control ^{*2}		510	495 (97.1)	405 (79.4)	10 (2.5)

*1 The percentages calculated with number of hatched fry.

*2 The eggs were fertilized with fresh sperm.

Table 3. Survival rate of the fry from eggs fertilized with preserved sperm for 2 weeks after hatching

Extender	Sperm (batch no.)	Initial no. of fry	Number of survived fry	Survival (%)
Extender A	1	80	76	95.0
	2	80	74	92.5
Extender B	1	80	69	86.3
	2	80	75	93.8
Control *1		80	71	88.8

*1 The fry hatched from the eggs fertilized with fresh sperm.

により平均68.6%の発眼率を得ており、さらにこれらを3年間保存しても発眼率はあまり変化しないことを報告している。⁴⁾ 今回の実験結果がKurokura et al.³⁾ のニシキゴイの結果と比較して発眼率が約30%低い結果となった原因は不明であるが、精液の種類が異なれば凍結方法あるいは凍結条件も異なることから、これらのことが原因となっている可能性も考えられる。

精液の凍結速度は精子の受精能力に影響を及ぼす要因として重要である。¹⁾ 今回用いたKurokura et al.³⁾ の凍結方法は、ストロー管を試験管に入れ試験管内の空気層を通して温度低下を調整して凍結することに特徴がある。

この方法を用いて行った今回のニゴロブナ希釈精液の予備凍結速度は $-6.7^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (Extender B)であったが、ニジマスにおける予備凍結速度は $-50^{\circ}\text{C}/\text{min}$ が適当であると言われており、⁵⁾ 精液の凍結速度が種類により大きく異なる結果となっている。ウニ精液の凍結保存においても凍結時の冷却速度が極めて重要であることが指摘されており、⁶⁾ 今後はプログラムフリーザーを用いて凍結速度を調節しより高い受精結果が得られるように検討する必要があるだろう。

精液の凍結保存をより効率的に行うためには上記で検討した凍結速度以外に1. 希釈液の組成及び希釈割合, 2. 抗凍結剤の組成及び添加割合, 3. 解凍方法など検討すべき項目は多数にのぼっており、今後は今回の結果を基準としてより高い受精率の得られる条件の検討が必要である。

謝 辞

本研究を行うに際して種々の御助言を賜った東京大学農業部黒倉 寿博士に心より感謝申し上げる。

摘 要

ニゴロブナ精液の凍結保存を試みた。希釈液として淡水硬骨魚類用生理食塩水等および凍結保護物質としてDMSOを用い、メタノール・ドライアイス中で予備凍結の後液体窒素で保存した。凍結保存3週間後に新鮮卵に受精したところ、孵化率は約40%で対照区の半分の値を示したが、奇形出現率および孵化後2週間の生存率には対照区との間に差は認められなかった。

文 献

- 1) 黒倉 寿 (1983) : 魚類精液の凍結保存、水産育種、8, 42-53.
- 2) 黒倉 寿 (1987) : 魚の精子と卵の凍結保存、回遊魚の生物学 (森沢正昭・会田勝美・平野哲也編) pp.222-234、学会出版センター、東京.
- 3) H. Kurokura, R. Hirano, M. Tomita, and M. Iwahashi (1984) : Cryopreservation of Carp Sperm, Aquaculture, 37, 267-273.
- 4) 黒倉 寿・富田政勝・岩橋正雄・宮尾 誠・岩田仲弘・平野礼次郎 (1984) : ニシキゴイ精液の長期保存、水産増殖、32(3), 148-152.
- 5) 川嶋尚正 (1987) : ニジマス精液の凍結、解凍時の温度変化が精子の生残に及ぼす影響、静岡水試験報、22, 61-70.
- 6) 黒倉 寿・八木信行・平野礼次郎 (1989) : ウニ精液の凍結保存に関する研究、水産増殖、37(3), 215-219.

