

3) 遺伝的不活性化精子の大量処理のための最適条件

井戸本 純一

【目的】雌性発生技術を集団育種に応用するためには、授精能力の高い遺伝的不活性化精子を大量に調製する必要がある。しかし、従来の処理方法は、多くの場合、実験段階での経験に基づいており、一度に処理できる精子数が少ないうえ、精子の希釈倍率や紫外線の照射量も研究者によって異なっていた。そこで、より安定的で効率的な技術を確立するため、精子1細胞あたりの照射量と雌性発生誘導成績との関係を明らかにした。

【方法】 **精子性状の測定** アルビノニジマス1尾から得た精液（精子容積率10.2%）を人工精漿で10倍に希釈し（以下、希釈精液）、昨年度考案した紫外線透過率測定用セルに注入して液層の厚さと紫外線透過率との関係を調べた（図1）。

雌性発生誘導試験 氷冷した希釈精液をプラスチックシャーレ（内径8.6cm）に10ml注入し、激しく振とうしながら殺菌灯の紫外線を $500\mu\text{W}/\text{cm}^2$ の強度で照射した。1回の照射ごとに5つの照射時間を設定し、照射中、所定の時間に0.1mlを抽出して速やかにニジマス通常魚の卵に媒精した。通常の発眼期にあたる積算水温約 $220^\circ\text{C}\cdot\text{日}$ （受精18日後）に検卵を行い、胚の生存率および黒い色素をともなう眼胞または眼点を持つ胚（黒眼胚）と持たない胚（無眼胚：アルビノの正常胚を含む）の出現率を算出した。

【結果および考察】 **1精子あたりの紫外線照射量** 希釈精液の液層の厚さと紫外線透過率との関係を図2に示した。y切片を100%とする回帰式から、照射時の液層の厚さが計算上1.72mmとなるシャーレ中の希釈精液は、照射された紫外線の99.6%を吸収したと考えられた。希釈精液の精子密度が $648\times 10^6\text{ cell}/\text{ml}$ であったことから、1つの精子が吸収した紫外線量は、毎分 $2.68\times 10^{-3}\text{ erg}/\text{cell}$ （以下、 $10^{-3}\text{ erg}/\text{cell} = \text{merg}/\text{cell}$ ）と推定された。

雌性発生誘導成績 各試験区における卵の発生状況を表1に示した。対照区では、発眼期生存率が32.5%と低かったが、これは卵質に問題があった可能性が高い。また、すべての生存胚が無眼胚であったが、これはアルビノであったためである。紫外線照射区の発眼期生存率は、30秒間から6分間までの各区では23.5%~40.7%とややばらつきが大きいものの、対照区と遜色のない値を示した。これらの区では、生存胚のほとんどが黒眼胚であり、無眼胚の中に正常な眼胞や血管網を有するものはなかったことから、すべての生存胚は雌性発生胚と考えられた。照射時間が8分間を超える区では、発眼期生存率は明らかに低下する傾向がみられ、20分間照射区では0%となった。

最適紫外線照射量 精子1細胞あたりに換算した紫外線照射量と雌性発生誘導成績との関係を図3に示した。最も照射量が少ない $1.34\text{ merg}/\text{cell}$ から、その12倍の $16.1\text{ merg}/\text{cell}$ に至るまで、雌性発生誘導の成功率は十分高く、精子の遺伝的不活性化に適した線量の幅は10倍以上の広範囲におよぶことが確かめられた。

以上のことから、紫外線透過率が10%になるように濃度と量を調節した精液に対して、紫外線を適正範囲の上限と考えられる $16\text{ merg}/\text{cell}$ となるように照射すれば、万一容器の底に付着するなどして滞留した精子があっても確実に遺伝的不活性化が可能と考えられる。このような条件は、今回用いた希釈精液の場合では、シャーレ1枚あたりに4.5mlを入れ、 $500\mu\text{W}/\text{cm}^2$ の紫外線を3分間照射するのに相当する。

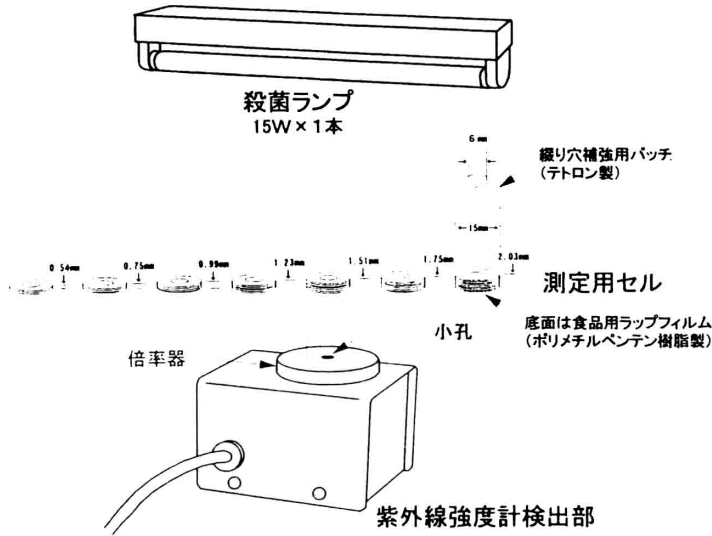


図1 精子懸濁液による紫外線透過率測定の概要.

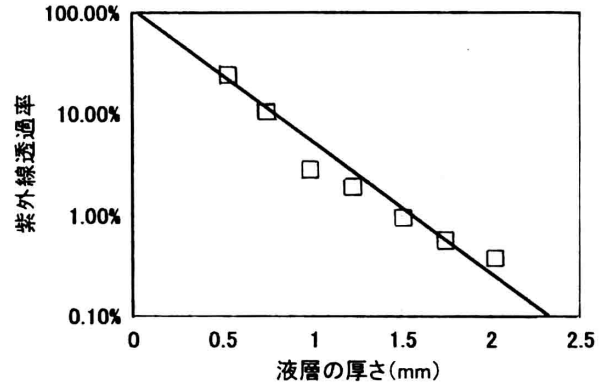


図2 供試精液における液量と紫外線透過率との関係.

表1 紫外線照射量の異なるアルビノ精子を通常卵に受精したニジマスの発生状況

Lot.	照射時間 (分)	紫外線照射量 (merg/cell)	供試 卵数	発眼期			孵化期		
				黒眼胚	無眼胚	生存率(%)	黒眼率(%)	生存魚	孵化率(%)
1	0	0	163	0	53	32.5	0.0	53	32.5
2	0.5	1.34	162	36	6	25.9	85.7	0	0.0
3	1	2.68	158	51	5	35.4	91.1	0	0.0
4	1.5	4.02	162	32	6	23.5	84.2	0	0.0
5	2	5.36	162	65	1	40.7	98.5	1*	0.6
6	3	8.04	161	46	1	29.2	97.9	0	0.0
7	4	10.7	162	46	3	30.3	93.9	0	0.0
8	5	13.4	161	39	5	27.3	88.6	0	0.0
9	6	16.1	162	43	1	27.2	97.7	0	0.0
10	8	21.4	160	32	1	20.6	97.0	0	0.0
11	10	26.8	159	11	0	6.9	100.0	0	0.0
12	12	32.2	165	20	0	12.1	100.0	0	0.0
13	14	37.5	162	15	1	9.9	93.8	0	0.0
14	16	42.9	162	1	2	1.9	33.3	0	0.0
15	18	48.2	160	2	0	1.3	100.0	0	0.0
16	20	53.6	161	0	0	0.0	—	—	—

* 黒眼仔魚.

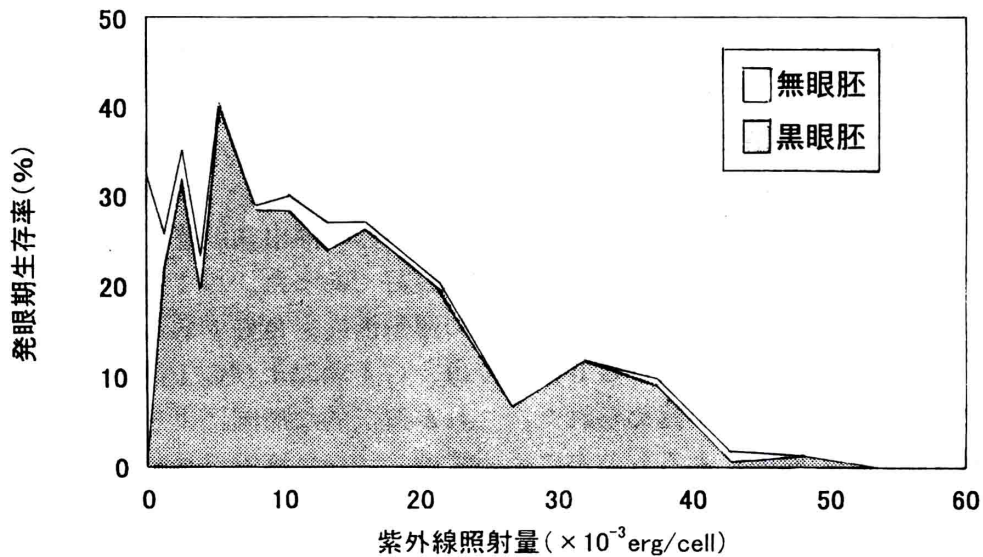


図3 精子1細胞あたりの紫外線照射量と胚の生存性との関係.