

1. 事業細目：バイオテク応用技術開発研究費 2. 研究名：精子の凍結保存に関する研究 3. 研究期間：昭和61年度～平成2年度	予算額 1,770千円 予算区分 国補 4. 担当者：藤岡、遠藤
5. 目的 重要魚介類の精子・卵の凍結保存技術を開発し、増養殖事業の効率化を図る。	
6. 方法 ニゴロブナ5尾とホンモロコ10尾からそれぞれ精子を採取し、精液：希釈液：DMS＝2：7：1の割合で混合し、0.5mlのストローチューブに封入した。使用した希釈液の組成は表1に示すものを使用した。凍結は、直径16mmのガラス試験管にストローチューブを5本入れ、これをメタノールドライアイス中に15分間浸漬する方法で行った。凍結精液はすぐに液体窒素中に収容し、21日後に取り出して受精させた。凍結精子の解凍は、20℃の地下水中にストローチューブを入れることによ	り行い、事前に用意したニゴロブナ卵とホンモロコ卵に媒精した。受精卵はスリガラス板に付着し、室温でフ化させた。フ化仔魚は、ワムシ・ミジンコを与えて2週間飼育し、生残率を比較した。
7. 結果の概要 凍結保存したニゴロブナとホンモロコ精子を受精した卵のフ化成績を表2に示した。新鮮なニゴロブナ精子を受精したコントロール区では発眼率97.1%、フ化率79.4%と良好な成績であったが、凍結保存精子を使用した卵では、発眼率は33.0～45.6%と低率であった。フ化率は、30.5～42.8%と発眼率との差はなく、発眼した卵はほとんどフ化した。フ化仔魚の外見的な奇形率は1.0～6.6%とコントロール区の2.5%との間に大差は認められなかった。 ニゴロブナの凍結保存精子を用いてフ化した仔魚の生残率を表3に示した。フ化後2週間の生残率は、コントロール区の88.8%に対し、凍結保存精子を用いた区では86.3～95.0%とコントロール区と差はなかった。 以上の結果をまとめると、今回の凍結保存条件によりニゴロブナとホンモロコ精子でコントロールの1/2程度のフ化仔魚を得られることが判明した。今回の凍結保存期間は21日間と短期間であったが、液体窒素中の保存期間はフ化率等にほとんど影響しないと考えられているので、保存期間を長くしても今回の結果と大差ないものと思われる。また、	凍結精子によるフ化成績は一般的にはかなり低率であるが、今回のフ化率30～40%は実用化への可能性を示唆するものと考えられる。

8. 主要成果の具体的数値

表1 精子凍結保存のための希釈液の組成 (g)

希釈液の種類	NaCl	KCl	CaCl ₂	NaHCO ₃	MgCl ₂	H ₂ O
I	0.75	0.02	0.02	0.002	0	100ml
II	0.44	0.62	0.022	0.002	0.008	100ml

表2 凍結保存精子を受精した卵の孵化成績

魚種	希釈液	No.	使用卵数	発眼率	孵化率	奇形率
ニゴロブナ	I	1	496	45.6	39.9	2.5
		2	550	41.6	41.1	6.6
	II	1	381	42.8	42.8	2.5
		2	270	36.7	36.3	1.0
	コントロール		510	97.1	79.4	2.5
	ホンモロコ	II	1	403	33.0	30.5

孵化率 = 孵化尾数 × 100 / 使用卵数 (%), 奇形率 = 奇形尾数 × 100 / 孵化尾数 (%).

表3 凍結保存精子で孵化したニゴロブナ仔魚の孵化後の生残率

希釈液の種類	No.	収容尾数	2週間後の生残尾数	生残率 (%)
I	1	80	76	95.0
	2	80	74	92.5
II	1	80	69	86.3
	2	80	75	93.8
コントロール		80	71	88.8

9. 今後の問題点

凍結保存精子を受精した卵のフ化成績を向上するために、希釈液の組成・凍結速度等をさらに検討する必要がある。また、ホンモロコ・ニゴロブ

ナ以外の重要魚介類についても凍結保存条件を検討するとともに、卵についても保存条件を研究する。

10. 次年度の具体的計画

ホンモロコ・ニゴロブナについての保存条件をさらに検討するとともに、アユ・ビワマス等についても凍結保存を試みる。

また、全雌魚生産の効率化を図るために、偽雄魚の精子の凍結保存を行う。