

リングル液で冷蔵保存したホシガレイ精子の活性と受精能

渋谷武久

Motility and Fertilizing Capacity of Chilled Spermatozoa of Spotted Halibut *Verasper variegatus* in Ringer's Solution

Takehisa SHIBUYA

ま え が き

ホシガレイ *verasper variegatus* はマツカワ属 *verasper* に属するカレイ科魚類で、本邦では太平洋沿岸、瀬戸内海、九州西部に分布する¹⁾。全長 65cm、体重 4kg 前後まで成長する大型のカレイであり、成長が早く、高い放流効果が期待されることから、国や青森県、岩手県、宮城県、茨城県、長崎県等の公的研究機関で栽培漁業の事業化を目指した種苗生産研究が実施されている²⁾。

福島県では 1991 年から種苗生産研究³⁾が、1993 年からは放流効果調査⁴⁾が進められてきた。雌親魚に対する LHRHa 投与技術⁵⁾の開発により、卵の大量確保が可能となったものの、依然として卵質や人工授精技術に課題があり、安定生産には至っていない。雄親魚は雌親魚と比べて魚体が小さく^{6,7)}、採精量は少量である。また、精子活性が著しく低い場合が多く^{8,9)}、雌雄間の成熟差と併せて、採卵作業時に良質な精液が不足する事態が生じることがある。

この課題の解決手法の一つとして精液の保存が考えられる。種苗生産現場においては、人工精奨（以下、リングル液）を用いた精液の希釈冷蔵保存法が特別な器材を必要としないため実用的である¹⁰⁾。精液の希釈冷蔵保存に関する研究は、シロザケ^{11,12)}、ニジマス¹³⁾、アマゴ¹⁴⁾およびワカサギ¹⁵⁾等のサケ科魚類で多くの研究が行われている。海産魚ではクロダイ¹⁶⁾、サワラ¹⁷⁾およびエツ¹⁸⁾等において精液の冷蔵保存が試みられている。持田ら¹⁹⁾は、ホシガレイおよびマツカワ精液のイオン組成を化学分析し、カレイ用リングル液を調製のうえ、希釈濃度別に保存日数と受精率を調査している。しかしながら、保存期間は最長でも 4 日程度と短く、生産現場での長期的な利用には課題が残されている。

そこで本研究では、種苗生産現場での精液不足に対応するため 20 日程度の冷蔵保存を目的に、有効なリングル液を探索し、保存日数と精子活性、受精能について検討した。また、精液の性状（精子濃度と pH）と精子活性の関係、精子活性の回復手法についても知見を得たので併せて報告する。

材料および方法

供試魚

供試魚は 2012 年 4 月から同年 10 月にかけて福島県沿岸で漁獲し、福島県水産試験場親魚池で飼育養成したホシガレイ成熟魚（雌 6 尾、雄 6 尾）を用いた。精液及び卵の採取は、2013 年 1 月

4日から同月28日までに全個体を対象に8回実施した。精液は雄の腹部を圧搾して採取し、2mlプラスチックチューブに分注後、4℃で冷蔵保存した。卵は同様に圧搾法により採取し、直径15cmのステンレスボウルに収容後、乾燥防止のためラップを施し4℃で冷蔵保存した。採取した精液及び卵サンプルは2時間以内に以下の試験に供した。

精液の性状と精子活性の関係（試験1）

採取した精液サンプルについて精子活性と精子濃度、精液pHを測定し、精子活性との関係を検討した。精子活性は、工藤ら¹²⁾の方法に従い、精子の50%以上が運動する場合を「3+」、50～10%が運動する場合を「2+」、10%未満が運動する場合を「1+」、すべて動かない場合を「0」とした。各サンプルにつき3回ずつ、光学顕微鏡下（200倍）で砂濾過海水（以下、濾過海水）を滴下、攪拌の後に精子運動を観察し、最大値をそのサンプルの活性とした。精子濃度は、濾過海水で5,000倍に希釈した精液をビルケルチルク血球計算盤に滴下し、顕微鏡下（200倍）で精子数を計数した。また、同時に、採精量の多い精液46サンプルについて、精液0.2mlをpHメーター（堀場pHメーターB-212）に採取し、pHを測定した。

リングル液による精液の保存（試験2）

精液の希釈冷蔵保存に有効なリングル液を探索するため、3種類のリングル液の保存効果を比較した。リングル液は成分組成が既知であるマツカワ用¹⁹⁾、トラフグ用²⁰⁾、およびサケ科魚類用¹⁸⁾を用いた（表1）。精液サンプルは精子活性3+のものを3サンプルを、それぞれ、マイクロピペットで0.05ml採取し、各リングル液で100倍に希釈・攪拌した後、1mlずつ24穴マイクロプレートに分注し4℃で冷蔵保存した。また、対照として未希釈精液についても同様に保存した。試験期間は保存後22日目までとし、試験1と同様の手法で精子活性を測定し、リングル液別の平均活性値と、各サンプル別の活性合計値（以下、保存能力値）を求め比較した。

表1 各種リングル液の組成

単位：mM

| リングル液 | NaCl | KCl | CaCl ₂ | MgCl ₂ | NaH ₂ PO ₄ | NaHCO ₃ | グルコース | HEPES |
|--------|--------|-------|-------------------|-------------------|----------------------------------|--------------------|-------|-------|
| マツカワ用 | 147.00 | 5.20 | 2.80 | 15.90 | 0.70 | 7.00 | 2.80 | 10.00 |
| トラフグ用 | 141.00 | 5.23 | 4.90 | 0.53 | 1.38 | 11.90 | 5.55 | — |
| サケ科魚類用 | 130.00 | 40.24 | 2.52 | 1.47 | — | 2.38 | — | — |

NaOH（1N）によりpHを8.0に調整

保存精液の受精能（試験3）

トラフグ用リングル液を用いて100倍に希釈し、4℃で冷蔵保存した精液について、保存18日目までに計5回の人工授精を行い、保存中の受精率を測定した。人工授精は、当日に採卵した新鮮な未受精卵2.0gに、保存精液0.02mlを媒精後、濾過海水100mlを混合し、室温（18～20℃）で管理し4時間後の卵割率（2～4分割）をもって受精率とした。また、対照として当日に採取した精液（活性3+）の受精率を同様に測定し、対照精液の受精率を100とした相対受精率を求めた。

リングル液保存による精子活性の回復（試験4）

トラフグ用リングル液で希釈冷蔵保存した不活性精子について経過時間別に活性の回復状態を比較した。精液は採精時に精子活性がないものを2サンプル用い、試験2と同様に100倍希釈した精子と、対照の未希釈精液を4℃で冷蔵保存し、保存後1、4、24時間目における精液のpHと精子活性および精子の最大運動時間を測定した。最大運動時間は、精子の前進運動が停止するまでの時間とし、スライドグラス上に採取した希釈精液または未希釈精液に濾過海水を混合し、顕

微鏡下（200倍）で精子運動を観察して求めた。

結 果

精液の性状と精子活性の関係（試験1）

精子活性と精子濃度、精液 pH の関係を図 1、2 に示した。精子濃度は $1.00 \times 10^9 \sim 7.23 \times 10^9$ sperm/ml の範囲にあり、平均値は 3.22×10^9 sperm/ml であった。精子活性は 0~3+ の範囲にあり、精子濃度との間に明確な相関は認められなかった。精液の pH は 6.0~7.6 の範囲にあり、中央値は 6.8 であった。精子活性と pH との間には正の相関関係が認められ、pH の上昇に応じて活性が上がる傾向にあった。精子活性は pH6.5 以下では 0~1+、pH7.0 以上では 1+~3+ を示し、pH7.5 付近で最も活性が高まる傾向にあった。

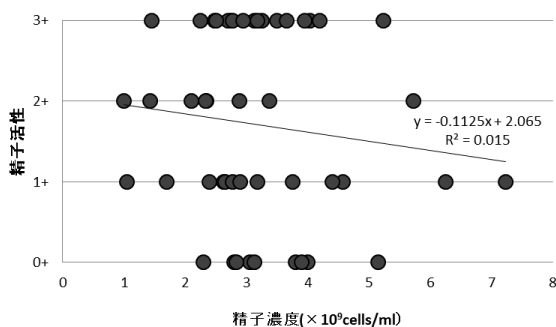


図1 精子活性と精子濃度の関係

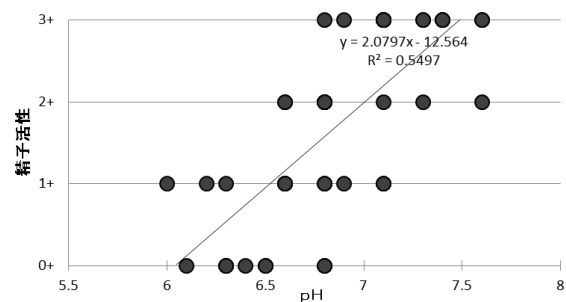


図2 精子活性と pH の関係

リングル液による精液の保存（試験2）

リングル液別の平均活性値を図 3 に、保存能力値を図 4 に示した。精子活性は、未希釈精液では保存 1 日目から活性が急速に低下し、保存 9 日目には完全に失活したのに対して、各種リングル液で保存した精液では 12~22 日目まで失活は無かった。保存能力値は、未希釈精液の 4~16 ポイント（平均 14.7）に対して、マツカワ用が 16~23 ポイント（平均 20.3）、トラフグ用が 30~55 ポイント（平均 42.3）、サケ科魚類用が 20~52 ポイント（平均 34.3）で、未希釈精子 < マツカワ用 < サケ科魚類用 < トラフグ用の順に高く、最も数値の高かったトラフグ用リングル液では約 3 倍の保存能力があった。

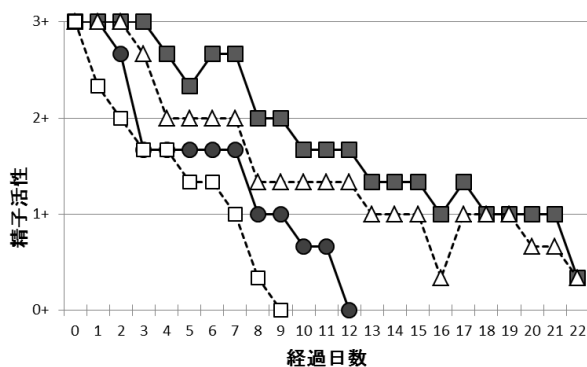


図3 リングル液別の精子活性の推移

● マツカワ用 ■ トラフグ用 △ サケ科用 □ 未希釈精液

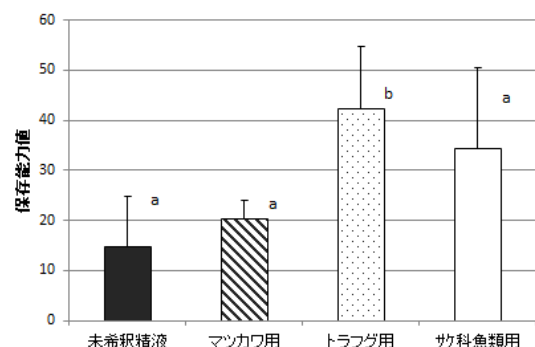


図4 リングル液別保存能力値の比較

各値は平均値 ± 標準偏差を示す
異なるアルファベット間有意差があることを示す (Dunnett検定 $p < 0.05$)

保存精液の受精能（試験 3）

トラフグ用リングル液で希釈保存した精液の保存日数別の受精率を表 2 に示した。希釈精液の受精率は 20.4～91.8%、同日採精精液の受精率は 24.0～77.2%の範囲で推移した。同日採精精液の受精率で補正した相対受精率は、4 日目に 101.0%、7 日目に 97.5%を示した後、14 日目までは 100%前後で横ばい状態にあったが、18 日目に 69.2%、21 日目には 88.5%を示した。

表2 リンゲル液希釈保存精液の受精率

| 項目 | 経過日数別・受精率(%) | | | | | |
|--------|--------------|------|-------|-------|------|------|
| | 4日 | 7日 | 11日 | 14日 | 18日 | 21日 |
| 希釈保存精液 | 78.0 | 58.2 | 39.1 | 91.8 | 20.4 | 78.7 |
| 同日採精精液 | 77.2 | 59.7 | 24.0 | 75.1 | 29.5 | 88.9 |
| 相対受精率 | 101.0 | 97.5 | 162.9 | 122.2 | 69.2 | 88.5 |

リングル液保存による精子活性の回復（試験 4）

リングル液希釈保存精液の pH と精子活性、運動時間を表 3 に示した。精液の pH は、未希釈精液が 6.3、希釈精液が 7.3～7.6 の範囲にあった。精子活性は、未希釈精液の活性 0 に対して、希釈精液では、1 時間目に 1+～2+、4 時間目以降は 2+を示した。精子の運動時間は、未希釈精液の 0 秒に対して、希釈精液では、1 時間目に 360～488 秒、4 時間目に 900～1,140 秒、24 時間目には 1,440～1,560 秒を示した。

表3 リンゲル液希釈保存精液の pHと精子活性、運動時間

| 試験区 | 1時間 | | | 4時間 | | | 24時間 | | |
|--------|-----|------|------|-----|----|--------|------|----|--------|
| | pH | 活性 | 運動時間 | pH | 活性 | 運動時間 | pH | 活性 | 運動時間 |
| 未希釈精液1 | 6.3 | 0 | 0s | 6.3 | 0 | 0s | 6.3 | 0 | 0s |
| 未希釈精液2 | 6.3 | 0 | 0s | 6.3 | 0 | 0s | 6.3 | 0 | 0s |
| 平均 | - | 0 | 0s | - | 0 | 0s | - | 0 | 0s |
| 希釈精液1 | 7.3 | 1+ | 360s | 7.3 | 2+ | 1,140s | 7.3 | 2+ | 1,440s |
| 希釈精液2 | 7.6 | 2+ | 488s | 7.6 | 2+ | 900s | 7.6 | 2+ | 1,560s |
| 平均 | - | 1.5+ | 424s | - | 2+ | 1,020s | - | 2+ | 1,500s |

考 察

精液の pH と精子活性の関係については、サケ科魚類で多くの報告がある。太田ら¹⁴⁾は、アマゴ精子の運動能と pH の関係を調査し、pH7.5 以下では精子運動は低く、pH8.0～8.5 で高い運動能を示すと報告している。また、宮本ら²¹⁾は、シロザケ精子を調査し、pH と精子運動時間には正の相関関係が認められたと報告している。本研究でも、ホシガレイ精液の pH と精子活性には同様に正の相関が見られ、pH6.5 以下で精子活性は低く、pH7.0 以上で高い活性を示すことを確認した。

精液保存用のリングル液については、持田ら¹⁹⁾がマツカワおよびホシガレイ精液のイオン組成を再現したマツカワ用リングル液を作成し、4日程度は受精能の保持が可能であることを示した。本研究では、複数のリングル液について保存能力を比較した結果、保存能力は未希釈精子<マツカワ用<サケ科魚類用<トラフグ用リングル液の順で高く、精子活性は最大22日目まで維持された。また、トラフグ用リングル液で希釈保存した精液の相対受精率は、14日目までは約100%、21日目においても約80%を示しており、十分に実用性があると考えられた。

本研究の結果、ホシガレイ精液をトラフグ用リングル液で希釈保存することで20日程度は精子活性と受精能を維持できることが明らかになった。実際の種苗生産現場では、毎週2回の頻度で約1ヶ月間にわたり採卵を行っているため、一度、良質な希釈保存精液を作成することで、半月分の採卵に十分対応できると考えられた。また、酸素通気や抗生物質の添加など特別な処理を必要とせず、小型の冷蔵庫でも保存可能なことから、生産現場では非常に有効な保存手法であると考えられた。

要 約

1. ホシガレイ精液の pH と精子活性には正の相関関係があり、pH6.5 以下では精子活性が低く、pH7.0 以上で活性が高まることを確認した。
2. 複数のリングル液を対象にホシガレイ精液の保存能力を比較した結果、未希釈精子<マツカワ用<サケ科魚類用<トラフグ用リングル液の順で保存能力が高く、最大22日目まで精子活性の維持が可能であった。
3. トラフグ用リングル液で希釈保存したホシガレイ精液の受精率は18日目においても約70%を維持しており、十分な実用性があると認められた。
4. 精子活性が認められないホシガレイ精液 (pH6.5 以下) をトラフグ用リングル液で希釈し、pH7.0 以上の条件で保存することで、精子活性が回復し、運動時間が増加することを確認した。

文 献

- 1) 中坊徹次：日本産魚類検索－全種の同定－（中坊徹次編）、東海大学出版会、1175-1185(1993)。
- 2) ホシガレイ栽培漁業技術開発推進検討会報告書、協会研究資料 No. 81、社団法人日本栽培漁業協会、東京、1-81(2002)
- 3) 福島県水産種苗研究所：平成3年度事業報告書、9-16(1991)。
- 4) 根本芳春・藤田恒雄・渡邊昌人：ホシガレイに関する研究－I、福水試研報、8、5-16(1999)。
- 5) 渡辺 透・平田豊彦・河合 孝：LHRHa コレステロールペレットを用いたホシガレイの採卵、福島種苗研報、4、13-17(2005)。
- 6) 佐久間徹：ホシガレイ種苗生産技術に関する研究、福島種苗研報、3、1-37(2001)。
- 7) 島村信也・安岡真司・水野拓治・佐々木恵一・根本義春：ホシガレイに関する研究－II、福水試研報、14、69-90(2007)。
- 8) 福島県水産種苗研究所：平成20年度事業報告書、2-5(2008)。
- 9) 福島県水産種苗研究所：平成21年度事業報告書、10-11(2009)。
- 10) 宇野将義・井野川仲男・黒倉 寿：ニジマス・アマゴの人工授精への保存精液の利用

- － 1、水産増殖、34、2(1986).
- 11) 広井 修・安川雅夫・末武敏夫：サケ・マス魚類の卵および精子の保存に関する研究－ 2、北海道さけ・ますふ化場研究報告、第 27 号、39-44(1973).
 - 12) 岩手県内水面水産技術センター：平成 7 年度年報、22-31(1995).
 - 13) 高橋一孝・猪田利夫・森沢正昭：ニジマス精子の簡便な保存法、養殖 1、101-105(1987).
 - 14) 太田博巳・鶴沼辰哉・名古屋博之：アマゴ精子の冷蔵保存用希釈液と媒精溶液の検討、日水誌、66(1)、88-96(2000).
 - 15) 井塚 隆：冷蔵保存したワカサギ精巣精子の運動能と受精能の検討、神水研研報、第 8 号、13-16(2003).
 - 16) 香川県水産試験場：昭和 62 年度事業報告、120-122(1988).
 - 17) 香川県水産試験場：平成 11 年度事業報告、108-113(2001).
 - 18) 中本 崇・福永 剛・濱崎稔洋・恵崎 撰：エツの人工授精に関する検討、福岡水技セ研報、第 14 号、21-24(2004).
 - 19) 持田和彦・有瀧真人・太田健吾・渡辺研一・大久保信幸・松原孝博：マツカワおよびホシガレイ精子の短期保存、北水研報告、64、25-34(2000).
 - 20) 古川 聡史：トラフグの高成長に関する遺伝的および分子生物学的研究、東京大学大学院、博士論文(2009).
 - 21) 宮本幸太・高橋史久・佐田 巖・羅津三則・小松信治・桑木基靖・徳田裕志・吉田 昇・伴 真俊：サケの発眼率とスパマトクリット、pH および精子運動時間との関係、北海道水産孵化場研報、64、17-22(2010).