

ネコギギ凍結精子保存方法と凍結精子を用いた人工授精

白木谷卓哉・石元伸一・青山裕晃・小山舜二

(2020年3月13日受付, 2020年3月31日受理)

Cryopreservation method of stumpy bagrid catfish *Pseudobagrus ichikawai* sperm and artificial insemination of cryopreserved spermSHIROKIYA Takuya^{*1}, ISHIMOTO Sinichi^{*2}, AOYAMA Hiroaki^{*3} and KOYAMA Shunji^{*4}

キーワード;ネコギギ, 凍結精子, 人工授精

国の天然記念物に指定されているネコギギは、ナマズ目ギギ科に属する淡水魚で、伊勢湾及び三河湾に注ぐ河川にのみ生息している。¹⁾特に三河湾に流下する豊川水系では、河川環境の改変により生息しているネコギギへの影響が想定されており、遺伝資源保護の必要性が高まっている。¹⁾ネコギギの遺伝資源保護のためには人工繁殖が必要となるが、ナマズ目魚類では人工授精を行う場合、雄から搾出による採精が困難なため、開腹して精巢を摘出し、精巢内精子を用いる必要がある。^{2,3)}このようにして得た貴重な精子を最大限有効利用し、人工授精や系統保存に活用していくためには、凍結保存精子を用いた人工授精法の開発が不可欠である。本報告では、ネコギギ近縁種のギギ精子を材料に凍結保存試験を実施し、凍結保存方法について検討するとともに、同技術をネコギギ精子に応用し人工授精試験を実施したので報告する。

(1) ギギ精子凍結保存試験

① ギギ精子を用いた試験

平成26年5~7月に計4回実施し、凍結に適した精子保存液(以下、保存液)及び凍結方法を検討した。

精子は同年に河川で採捕したギギの雄1個体から取り出した精巢を淡水魚用リング液⁴⁾(以下、リング液)内で懸濁させたものを用いた(以下、精子懸濁液)。

保存液は、精子懸濁液を凍結防御剤としてメタノール又はDMSO(ジメチルスルホキシド)を10%濃度で添加したリング液又は牛胎児血清(以下、FBS)で10倍に希釈して作成した。その後、その保存液を0.5mL容の精液保存用ストロー管へ0.45mL注入した。⁵⁾

凍結方法は、ストロー管を液体窒素液面上10cmに固定し液体窒素蒸気に15分間曝して凍結した後、液体窒素へ収容する方法(以下、蒸気法)及びストロー管を内径16mmのガラス試験管に入れ、開口部をアルミホイルで覆い、液体窒素に浸漬して凍結する方法⁵⁾(以下、試験管法)を試みた。

凍結保存7日後、約1カ月後、約6カ月後に解凍し、精子の運動活性(以下、運動活性)を調べた。解凍はストロー管を20°C⁶⁾の水道水に15~20秒浸して行った。運動活性は解凍した保存液をスライドガラスに取り、純水を加え攪拌した後直ちに検鏡して、運動している精子の割合を表1に示す6段階で評価した。

ギギ精子の凍結保存試験結果を表2に示した。各保存液の凍結前の精子運動活性は4+~5+であった。

表1 精子運動性の評価指標

評価指数	精子運動活性
5+	75~100%
4+	50~74%
3+	25~49%
2+	10~24%
1+	1~9%
0	0%

第1回及び第2回試験では、凍結防御剤にメタノールを用いたいずれの保存液内の精子の運動活性は、凍結方法に関係なく良好な結果が得られた。第3回試験ではメタノールを用いた蒸気法では運動活性が確認できず、試験管法が優れていると考えられた。このことから、ギギ精子を凍結保存する場合には、「保存液はメタノールを10%濃度で添加したリング液又はFBSを用いて、試験管

*1 愛知県水産試験場 内水面漁業研究所 三河一宮指導所 (Mikawa Ichinomiya Station, Freshwater Resources Research Center, Aichi Fisheries Research Institute, Toyotsu, Toyokawa, Aichi 441-1222, Japan)

*2 愛知県水産試験場 (Aichi Fisheries Research Institute, Miya, Gamagori, Aichi 443-0021, Japan)

*3 愛知県水産試験場 内水面漁業研究所 (Freshwater Resource Research Center, Aichi Fisheries Research Institute, Isshiki, Nishio, Aichi 444-0425, Japan)

*4 いであ株式会社 名古屋支店 (IDEA Consultants, Inc, Irifune, Minato-ku, Nagoya, Aichi 455-0032, Japan)

表2 ギギ精子の凍結保存試験結果

種類	凍結防御剤	凍結方法	第1回試験(凍結前5+)			第2回試験(凍結前4+)			第3回試験(凍結前5+)			第4回試験(凍結前5+)		
			7日間保存	約1カ月保存	約6カ月保存	7日間保存	約1カ月保存	約6カ月保存	7日間保存	約1カ月保存	約6カ月保存	7日間保存	約1カ月保存	約6カ月保存
リングル液	メタノール	試験管	4+	4+	4+	3+	3+	3+	4+	5+	5+	5+	5+	5+
		蒸気	4+	4+	4+	3+	3+	3+	0	0	0	—	—	—
	DMSO	試験管	2+	0	0	1+	0	0	0	1+	1+	—	—	—
		蒸気	2+	0	0	1+	1+	0	0	0	0	—	—	—
FBS	メタノール	試験管	4+	4+	4+	3+	3+	3+	5+	5+	5+	5+	5+	5+
		蒸気	2+	4+	5+	3+	3+	3+	0	0	0	—	—	—
	DMSO	試験管	1+	1+	0	1+	0	0	0	1+	1+	—	—	—
		蒸気	2+	1+	1+	1+	0	0	0	0	0	—	—	—

—:試験設定なし

法で凍結する」方法が適していると考えられた。この凍結方法の再現性を確認するため行った第4回試験では、リングル液、FBS いずれの保存液でも第3回試験同様に安定した運動活性が得られた。

②ネコギギ精子への応用

平成26年7月にへい死したネコギギ雄個体(個体番号♂C2-1)から取り出した精巣から得られた精子(運動活性4+)について、前述したギギ精子の凍結方法(保存液;メタノール+FBS)を用いて凍結精子を作成した結果、6カ月保存後の運動活性は3+であった。さらに、平成27年6月10日にネコギギ雌個体(個体番号♀3C)から卵が得られる機会に遭遇したため、予備的試験として、当該凍結精子(運動活性2+)を用いて乾導法により人工授精を試みた結果、ふ化仔魚2尾(ふ化率1.5%)が得られたことから受精が可能であり、また、ギギ精子の凍結方法がネコギギ精子へ応用可能であることが明らかとなった。

(2)ネコギギ人工授精試験

試験は令和元年6月15日及び26日に計2回実施した。試験に供した精子は、平成30年度及び令和元年度にネコギギ雄4個体(個体番号♂C1-12,♂C1-13,♂C2-6,♂C1-14)から作成した凍結精子を用いた(以下、凍結精子)。また、そのうち雄2個体(個体番号♂C2-6,♂C1-14)の精巣の一部をマス類用人工精しょう⁷⁾(以下、人工精しょう)に懸濁させた精子懸濁液を冷蔵庫で保管し、試験時に取り出して対照として用いた(以下、新鮮精子)。

凍結方法は、(1)ギギ精子の凍結保存で適していると判断された方法を用いたが、一部、凍結防御剤としてDMSOを用いた試験区及びリングル液の代わりに人工精しょうを用いた試験区を設けた。保存液は、リングル液又は人工精しょう1mLあたり精巣湿重量0.02~0.04gの濃度で作成した精子懸濁液を、2倍、5倍又は10倍に希釈したものを用いた。

解凍は(1)ギギ精子の解凍方法と同様とした。また、媒精時に運動している精子の数(以下、運動精子数)を、運動活性と保存液(新鮮精子は媒精時の精子懸濁液)1mLあ

たりの精子の数(以下、精子数)の積により求めた。

運動活性は表1の評価基準に基づいた。精子数は手動式血球計数装置(トーマ血球計算盤 サンリード硝子有限公司)を用いて算出した。

各試験区における精巣重量、精子懸濁液の種類及び濃度、希釈倍率及び保存液の条件を表3に示した。

表3 精巣重量、精子懸濁液の種類及び濃度、希釈倍率及び保存液の条件

試験区分(試験日)	試験区	雄(採精)個体番号	精子の種類(保存期間)	精巣重量(g)	精子懸濁液		希釈倍率	保存液の条件	
					濃度(精巣g/mL)	種類		種類	凍結防御剤
第1回(6/15)	1-①	♂C1-12	凍結精子(298日)	0.04	0.02	リングル液	5	リングル液	DMSO
	1-②	♂C1-13	凍結精子(388日)	0.02	0.02	リングル液	10	リングル液	メタノール
	1-③			0.02	0.02	人工精しょう	10	人工精しょう	メタノール
	1-C	♂C2-6	新鮮精子(採精直後)	0.07	—	人工精しょう	—	—	—
第2回(6/26)	2-①	♂C1-14	凍結精子(1日)	0.14	0.04	リングル液	2	リングル液	メタノール
	2-②			0.04	0.04	リングル液	5	リングル液	メタノール
	2-③			0.04	0.04	リングル液	10	リングル液	メタノール
	2-C	—	新鮮精子(冷蔵1日)	0.05	—	人工精しょう	—	—	—

人工授精は、平成20年度及び27年度に人工繁殖試験で得られたネコギギ雌2個体(個体番号♀C3-7,♀C8-1)に、動物用胎盤性生殖腺刺激ホルモン(ゴナトロピン3000,あすか製薬)を投与し搾出した卵を用い、乾導法により実施した。媒精時の精子量は、凍結精子は1試験区あたりストロー管1本分(0.45mL)、新鮮精子は卵に充分いきわたる程度の適量とした。

各試験区の雌雄組み合わせ、運動活性、運動精子数及び人工授精試験結果を表4に示した。

凍結精子の運動活性は、試験区1-①(298日保存)は3+、試験区1-②,③(388日保存)は3+~4+であり、凍結保存約1年後も運動活性を有していた。また、試験区2-①~③の凍結精子は、凍結前の運動活性は5+であったが、凍結保存1日後には4+に低下していた。

人工授精を実施した結果、全ての試験区でふ化仔魚が得られた。凍結精子のふ化率は、凍結保存約1年後の精子を用いた第1回試験は1.1~19.8%、凍結保存1日後の精子を用いた第2回試験は4.3~28.6%であり、各試験と

もにふ化率に大きなバラツキが見られた。受精率は媒精した精子量や精子の濃度と関係性があるが、^{8, 9)} 各試験区で媒精した精子量は全て同量であったことから、精子の濃度つまり運動精子数の多寡による影響が考えられた。

そこで、同一精巢で作成し、各試験区の供試卵数に大きな差がない第2回試験について、各試験区の運動精子数とふ化率との関係を調べた。

運動精子数が最も多い試験区 2-① (67,500 千個/mL) のふ化率は 28.6%であるが、運動精子数が 1/2 以下である試験区 2-② (30,420 千個/mL) のふ化率 26.1%と大きな差はなかった。一方、試験区 2-③ (16,560 千個/mL) のふ化率は 4.3%で、運動精子数が約 2 倍である試験区 2-②のふ化率 26.1%と比較すると非常に低かった。低濃度の精子で媒精すると、精子が卵に接触する前に運動性を失い受精できない卵が多くなることから、⁹⁾ 試験区 2-③は受精に必要な運動精子数が試験区 2-②と比較して大幅に不足している可能性が示唆された。

なお、第1回試験では、DMSO を用いた試験区 1-①のふ化率はメタノールを用いた試験区 1-②, ③より高かった。この要因は不明であるが、メタノールと DMSO を用いた保存液は異なる精巢で作成したことから、同一精巢で作成した保存液を用いて検証する必要がある。

本研究では、ギギ精子の凍結方法を応用して作成したネコギギ凍結精子のふ化率は、最大で約 30%(新鮮精子の約 2/3)であることが明らかになった。今後、ふ化率の向上と安定化に向けて、希釈倍率や運動精子数とふ化率との関係把握及び凍結防御剤の検証を行う必要がある。

謝 辞

本研究は国土交通省中部地方整備局設楽ダム工事事務所委託事業「希少淡水魚増殖技術開発試験」により実施

した。近畿大学農学部水産学科太田博巳教授にはネコギギ精子の凍結方法及び人工授精試験について指導を頂いた。設楽ダム工事事務所調査課担当職員の方々にはネコギギ精子採取について関係機関との調整に尽力頂いた。いであ株式会社名古屋支店環境技術・生態部の白井早苗氏始め担当職員の方々には試験実施にあたり多大なる協力を頂いた。ここに謝意を表する。

文 献

- 1) 渡辺勝敏(2012) ネコギギ: 積極的保全に向けたアプローチ. 魚類学雑誌, 59(2), 168-171.
- 2) 隆島史夫・村井衛(編) 淡水魚. 水産増養殖システム 2, 恒星社厚生閣, 東京, pp362.
- 3) 藤井亮史(2017) ナマズ精子の希釈液による運動性の比較, 岐阜県水産研究所研究報告 (64), 27-33.
- 4) 板沢靖男・羽生功(編) (1991) 魚類生理学, 恒星社厚生閣, 東京, pp624.
- 5) 宮本廉夫・山田敏之・長野直樹・高見生雄・門村和志・土内隼人・築山陽介・久保田泰則(2006) 凍結保存精子を用いたマハタ人工授精. 長崎県水産試験場研究報告 (32), 17-21.
- 6) 藤岡康弘(1992) ニゴロブナ精液の凍結保存の検討. 滋賀県水産試験場研究報告 (42), 1-3.
- 7) 山梨県魚苗センター(1987) 昭和 62 年度バイオテクノロジー連絡試験計画案. 第 12 回全国養鱒技術協議会要録, 岩手県, 143-147.
- 8) 齊藤節男・森立成(2005) ヒラメ・カレイ類精液の凍結保存(第 3 報) クローンヒラメ偽雄精子の長期保存. 北海道立水産試験場研究報告 (69), 135-138.
- 9) 岩松鷹司(1999) 硬骨魚類の受精(Ⅲ). 愛知教育大学研究報告, 自然科学編, 48, 47-57.

表 4 雌雄組み合わせ、運動活性、運動精子数及び人工授精試験結果

試験区分	試験区	雌(採卵) 個体番号	雄(採精) 個体番号	精子の種類 (保存期間)	運動活性	運動精子数 (千個/mL)	供試卵数 (粒)	正常ふ化尾数 (尾)	正常ふ化率
第1回	1-①	♀C3-7	♂C1-12	凍結精子 (298日)	3+	10,350	106	21	19.8%
	1-②		♂C1-13	凍結精子 (388日)	4+	11,550	134	10	7.5%
	1-③				3+	8,970	94	1	1.1%
	1-C		♂C2-6	新鮮精子 (採精直後)	5+	21,360	205	96	46.8%
第2回	2-①	♀C8-1	♂C1-14	凍結精子 (1日)	4+	67,500	91	26	28.6%
	2-②				4+	30,420	88	23	26.1%
	2-③				4+	16,560	70	3	4.3%
	2-C			新鮮精子 (冷蔵1日)	5+	68,880	85	35	41.2%