

## 人工精漿によって希釀した精液の有効性

岡崎 稔・熊崎 博

Availability of Sperm diluted with Artificial Seminal plasma

Minoru OKAZAKI・Hiroshi KUMAZAKI

従来、アユの受精作業は卵200～300g（雌魚約30尾分）採卵毎に使用雌尾数のおよそ半数の雄魚から1尾ずつ採精し、媒精している。三浦<sup>1)</sup>は、従来法では採精作業に多くの時間を要することから、採卵・採精作業の効率化を図るために、高橋<sup>2)</sup>らがニジマス用に考案した人工精漿（以下人工精漿という）で希釀保存した精液を用いたところ、その発眼率は従来の方法に比べて遜色がなく、事業規模での応用の可能性が示唆されたと報告している。

そこで、事業規模への応用に向けて、適正な希釀倍率、希釀後媒精までの経過時間が発眼率に及ぼす影響等について、数例の試験を試みたので報告する。

### 試験－1 希釀精液の希釀倍率と媒精までの経過時間について

### 材料及び方法

試験は、1992年と1993年に実施した。

#### <1992年の試験>

試験は10月22日、同24日、同27日の3回行った。

供試魚は、木曽川で採捕された親魚を雌、雄各1尾ずつ用い、排出後完熟卵を0.4gずつ16区分、精液は0.04mlずつ13区分、精液は0.04mlずつ4区分し、試験に供した。

精液は、人工精漿（第1表）により、20倍、50倍及び100倍に希釀し、希釀後0分、60分、120分及び180分に精液0.04mlを媒精した。

受精卵の一部をスライドグラスに付着させて、数時間～1日後に着卵数を計数し、6～7日後に発眼率を調査した。

また、希釀一定時間後に使用する供試卵と希釀精液は、それぞれ蓋付きプラスチック滅菌シャーレに収容し、井戸水を掛け流した水面上に浮かべて、乾燥を防ぐとともに温度を一定に保った。なお、以下の試験の発眼率の調査方法、供試卵及び希釀精液の保存方法は同様とした。

第1表 ニジマスの人工精漿液

塩化ナトリウム	7.60 g
塩化カリウム	2.98 g
塩化カルシウム	0.37 g
塩化マグネシウム（2水塩）	0.31 g
炭酸水素ナトリウム（6水塩）	0.21 g
水	1,000ml (pH8～9)

#### <1993年の試験>

試験は10月15日に行った。

河川で採捕された親魚を雌雄1尾ずつ用い、排出後完熟卵を0.4gずつ16区分、精液は0.04mlずつ4区分し、試験に供した。

精液は人工精漿（pH8.0）により、20倍、50倍及び100倍に希釀し、希釀後0分、20分、60分、180分及び360分に希釀精液一滴（約0.04ml）によって媒精した。

この試験の外に20倍希釀精液を用いて、24時間後に媒精する区についても同様の方法で行い、供試卵は媒精3時間前に採卵したものを用いた。

精子の活力は、極少量の精液をスライドグラス上に取り、一滴の淡水で素早く攪拌混合後、低倍率（×150）の顕微鏡下でその動きを観察し、運動精子の割合、運動形態及び運動時間で表示した。

## 結果及び考察

1992年の試験結果を第2表に、1993年の試験結果を第3表にそれぞれ示した。精液を希釈しないで直ちに媒精した対照区の発眼率を100として、各区の発眼成績を比較した。

		第2表 人工精漿希釈精液の発眼指數の比較			
希釈倍率(倍)	項目 経過時間(分)	発 眼 指 数			
		1回 10月22日	2回 10月24日	3回 10月27日	平均
対照区 原液	0	100*	100*	100*	100*
20	0	93	102	16	70
	60	85	90	118	98
	120	91	91	117	100
	180	113	101	114	109
50	0	99	88	3	63
	60	109	93	84	95
	120	86	91	111	96
	180	120	89	107	105
100	0	110	64	2	59
	60	116	93	110	106
	120	98	99	118	105
	180	111	92	109	104
水温(°C)		媒精まで17.0、受精卵収容池16.0			

注1) \* 対照区の発眼指數を100とした場合

2) \*\* ( ) 内は発眼率

1992年の試験では、希釈後直ちに媒精した各区の平均発眼指數は、20倍区は70、50倍区は63、100倍区は59で対照区より低かった。

60分及び120分後に媒精した20倍区の平均発眼指數は98~100、50倍区は95~96を示し、対照区とほぼ同じであった。また、180分後の平均発眼指數は、20倍区は109、50倍区は105を示し高くなる傾向を示した。

100倍区は、前2区とは若干異なり、希釈直後の発眼指數以外はいずれも対照区より高く、104~106を示した。

1993年の試験では、希釈後直ちに媒精した各区の平均発眼指數は、20倍区は122と高率であったが、50倍区は83、100倍区は90と低率であった。

20~360分後の発眼指數は全区が対照区より高く、20倍区は121~129、50倍区は126~137と比較的安定した数

第3表 人工精漿希釈精液の発眼指數の比較

希釈倍率(倍)	項目 経過時間(分)	発 眼 指 数		
		人工精漿pH8.0 発眼指數	精子活力	—
対照区 原液	0	100*	—	(67.6%) **
20	0	122	—	
	20	121	1/1+++13 ***	
	60	123	1/1+++14	
	180	129	1/1+++14	
	360	129	1/1+++11	
	0	90	—	
50	20	126	1/1+++13	
	60	136	1/1+++14	
	180	127	1/1+++11	
	360	137	1/1+++13	
100	0	83	—	
	20	114	1/1+++13	
	60	143	1/1+++16	
	180	122	1/1+++11	
	360	115	1/1+++13	
水温(°C)		媒精まで 受精卵収容池	17.4 16.5	

注1) \* 対照区の発眼指數を100とした場合

2) \*\* ( ) 内は発眼率

3) \*\*\* 1/1 運動精子の割合

+++ 運動形態

13 運動時間 秒

(以下第4、5表も同様)

値を示したが、100倍区は114~143とバラツキが大きかった。

20倍希釈精液を用いて24時間後に媒精した区（精子の活力2/3+++14）は、対照区より良好な発眼指數を示し、それぞれ112、128で、平均は120であった。

以上の両年の結果から、搾出精液を人工精漿で20~100倍に希釈し使用する場合、希釈後20分から6時間までいずれも対照区と同等かそれ以上の高い発眼成績を得ることが期待できること、また、20倍希釈の場合は24時間後でも同様の傾向が見られることから、その実用性は高いと考えられた。

## 試験-2 希釈精液の媒精量について

## 材料及び方法

木曽川で採捕された親魚雌3尾と雄1尾を用いて、1993年10月14日に試験を行った。

雌は1尾毎に完熟卵を0.1、0.2、0.4、0.8、1.6g及び3.2gに6区分し、雄は1尾の搾出精液を人工精漿(pH 8.0)によって、重量換算で20倍希釈し、1時間後にそれぞれの卵群に希釈精液一滴(約0.04ml)を用いて媒精した。

## 結果及び考察

試験結果は第4表に示した。供試雌親魚AとB及びCの3~6区は全区が80%以上を占めた。しかし、Cの1~2区は64%と低率であったが、この2区の低い原因については不明であった。

3者の平均発眼率は、Aが86.7%、Bは86.1%、Cは80.3%であり、Cの低い原因は不明であったが、AとBの間に一定の傾向は見られなかった。

以上の結果から、20倍希釈精液使用時の媒精量は、卵重量の1/80でも充分であり、高い発眼率を得ることができた。

第4表 人工精漿(pH8.0)による20倍希釈精液の媒精量

項目 区分	卵重量 (g)	卵重に対する 媒精比率(ml/g)	発眼率(%) A	発眼率(%) B	発眼率(%) C
1区	0.1	1/2.5	86.2	91.7	64.0
2区	0.2	1/5	80.0	84.6	64.4
3区	0.4	1/10	82.1	85.2	81.9
4区	0.8	1/20	92.2	88.6	88.7
5区	1.6	1/40	85.7	86.4	86.3
6区	3.2	1/80	91.9	83.2	90.8
平均			86.7	86.1	80.3
水温(℃)	媒精まで17.7、受精卵収容池16.5				

注1) A、B、Cは供試雌親魚

2) 供試雄魚の精子活力は1/1+++15

## 材料及び方法

長良川で採捕された親魚を用いて、1993年10月28日に試験を行った。

搾出完熟卵を0.4gずつ4区分し、雄は搾出精液と搾出後の精巣をほぼ均一になるよう3区分し、pH8.2、9.0及び10.0の人工精漿を用いて重量換算でそれぞれ20倍に希釈した。精巣内精子は希釈液内で細断し賦活化を図った。

人工精漿のpHの調整は、1N-NaOHを滴下混和して行った。

媒精は希釈3時間30分後に精子の活力をチェックした後、希釈精液0.04mlによって行った。なお、供試卵は採卵後3時間経過した卵を用いた。

## 結果及び考察

調査結果を第5表に示した。pH8.2の人工精漿を用いて希釈した区の発眼率は、搾出精液希釈区は87.6%に対して精巣内精子希釈区は58.0%で、明らかに前者が高率を示した。また、精巣内精子希釈区間の発眼率は、pH8.2区は58.0%と低率であったが、pH9.0区及びpH10.0区は84%台の高率であった。

以上の結果及び試験-1の結果から、精巣内精子の希釈に用いる人工精漿のpHは9.0~10.0の範囲が適当と考えられた。一方、搾出精液の希釈には人工精漿のpHを調整しないpH8.0~8.2で良いものと思われた。

第5表 搾出精液及び精巣内精子を用いたときの精子の活力と発眼率

項目 区分	人工精漿液 pH	精子の活力 希釈倍率(倍)	発眼率 (%)
搾出精液	8.2	20	1/1+++21 87.6
精巣内精子	8.2	20	ごく少数+++19 58.0
	9.0	20	1/4~1/3+++19 84.1
	10.0	20	1/2+++23 84.2
水温(℃)	媒精まで17.0、受精卵収容池16.0		

## 試験-3 精巣内精子を用いたときの発眼率に及ぼす人工精漿のpHの影響について

## 試験-4 事業における従来法と人工精漿希釈精液を用いたときの発眼率の比較について

## 材料及び方法

木曽川で採捕された親魚雌326尾、雄45尾を用いて、1993年10月11日に試験を行った。

卵200～300g（雌約30尾分）毎に使用雌尾数の約半数の雄魚から1尾ずつ採精し、攪拌して媒精させる方法（従来法）と卵群に雄20数尾の搾出精液を混合して、人工精漿（pH8.0）によって20倍希釈し、1時間後に卵重の約1/10量の希釈精液を用いて媒精する2方法について比較した。

## 結果及び考察

調査結果を第6表に示した。従来法の発眼率は53.5%と61.7%（平均56.2%）に対して、20倍希釈精液区は74.5～87.5%（平均79.9%）を示し、後者の平均発眼率は前者を20%以上も大きく上回った。

また、この試験の外に10月5、8、9、10、14、15日の6回を従来法で、同18、19、20、21日の4回を人工精漿（pH8.0）による希釈精液（20～50倍希釈）で卵重量の1/10～15量を用いて40～60分後に媒精させた発眼率を比較すると、従来法では54.6～75.9%（平均63.7%）に対し、希釈精液区は73.2～88.2%（平均79.3%）を示し、前試験と同様希釈精液区は従来法に較べて15%以上の高い発眼率であった。

以上の結果から、人工精漿希釈精液を使用すると従来法に比較して発眼率の向上が図られるとともに親魚数が少なくてすみ、また、採精から媒精までの作業の効率化が図られ、今後積極的に活用すべきであろう。

## 要 約

1. 高橋らがニジマス用に考案した人工精漿により、アユ精液を希釈する場合の適正な希釈倍率、媒精までの保存時間、希釈精液の媒精量及び人工精漿の至適pHの究明、さらに精巣内精子の利用等について検討を加えた。

第6表 従来法及び希釈精液を用いたときの発眼率の比較

項目	雌 (尾)	卵重 (g)	雄 (尾)	発眼率 (%)
区分	42	180	13	53.5
	37	210	10	61.7
合 計	79	390	23	(56.2)
希釈精液	39	222		80.3
	49	266		74.5
	52	314	22	77.9
	62	253		81.1
	45	266		87.5
合 計	245	1,321	22	(79.9)
水温 (°C)	媒精まで 受精卵収容池		16.0	16.0

注 ( ) 内は平均値

2. 人工精漿を用いて、希釈倍率と保存時間を比較した結果、20倍、50倍及び100倍区とともに希釈20分後から6時間後までの長時間にわたって受精能力が持続した。
3. 20倍希釈精液（pH8.0）使用時の媒精量は、採卵重量の1/80でも充分と考えられた。
4. 精巣内精子について、pHの異なる人工精漿を用いて20倍希釈し、発眼率を比較した結果は、pH9.0～10.0の範囲が適当と考えられた。一方、搾出精液は人工精漿のpHを調整しないpH8.0～8.2で良いものと思われた。
5. 人工精漿希釈精液を導入した場合の発眼率は、74.5～87.5%（平均79.9%）となり、従来法より20%以上の高い数値を示した。

## 文 献

- 1) 三浦 航, 1993 ; 希釈精液を用いたアユ卵の受精について. 平成3年度岐水試業報.
- 2) 高橋一孝, 1984 ; マス類の染色体操作による育種試験—I 温度ショックによるニジマス染色体の倍数化. 山梨県魚苗センター事報, 84～91.