

アユ種苗生産における人工精漿によって希釀した精液の有効性—II

岡崎 稔・桑田知宣・森 茂壽

Availability of Sperm with Artificial Seminal Plasma to Seeding for Ayu,*Plecoglossus altivelis*—II

Minoru OKAZAKI・Tomonori KUWADA・Shigehisa MORI

1992年と1993年にわたって、高橋ら¹⁾がニジマス用に考案した人工精漿により、アユ精液を希釀する場合の希釀倍率、媒精までの保存時間、希釀精液の媒精量及び人工精漿のpH、精巣内精子の利用等について検討を加えたところ²⁾、希釀精液の有効性が認められ、一部事業規模での活用が図られているが、発眼率の向上する原因は明確になっていない。ニジマスでは精巣内精子を用いた場合、培養する人工精漿のpHによって種苗生産成績が異なり、それが精子の運動性の差によるものであることが報告³⁾されている。したがって、前述した発眼成績の差は精子の運動性の差による可能性が考えられる。そこで、本年度はpHの異なる人工精漿中における搾出精液精子の運動性の獲得等について調査をしたので報告する。

試験－1 搾出精液精子の人工精漿中での培養時間に伴う運動性の獲得

1. 搾出直後の精子の活性

材料及び方法

1994年11月1日に長良川で採捕されたアユ雄魚12尾を供試魚とし、水温17°Cで蓄養後翌日試験を行った。

各供試魚から、極少量の精液をスライドグラス上に搾出し、一滴の淡水魚用リンゲル液で素早く攪拌混合後、低倍率(×150)の顕微鏡下で一視野中の運動精子の割合、運動時間を観察した。

第1表 採精直後の精子の活性

親魚 (No.)	動く精子の割合 (%)	精子の運動時間 (秒)
1	0	0
2	90	58
3	≤10	11
4	0	0
5	0	0
6	30	6
7	≤10	8
8	80	5
9	60	54
10	≤10	39
11	0	0
12	0	0

結果及び考察

採精直後の精子の運動活性の状況を、第1表に示した。精子に運動性の見られない個体は5尾、見られた個体は7尾であった。比較的高い割合で、運動性のある精子

を持つ個体でも、その精子の運動時間は短時間である場合もあり、動く精子の割合と運動時間の間に相関は見られなかった。

採精直後に運動性のない精液を、そのまま数分間放置した後に再度調査したところ、5尾中2尾(個体No.11、

12) に運動性が認められるようになった。

No. 11の 5 分後と 8分後の動く精子の割合は30%と20%、運動時間は30秒と58秒であった。一方、No. 12は 2分後に10%以下、10秒であり、採精直後に運動性のない精子でも放置することによって、ある程度賦活化される傾向が伺えた。

2. 搾出精液の人工精漿中での培養時間に伴う運動性の獲得とpHの影響

材料及び方法

前試験の供試魚No.12の精子を新たに搾出し、蓋付き滅菌シャーレに0.1mlずつ3区分した。その精液をpH7.4、8.2 及び9.2に調整した人工精漿で50倍希釀し、観察まで室温で放置した。観察は希釀5～8分後から60分後まで行い、逐次pH7.4、8.2、9.2の順に5分間隔でマイクロビペットにより、希釀精液0.001mlをスライドグラス上に取り、これに生理食塩水0.01mlを混合攪拌し、低倍率(×150)の顕微鏡下で一視野中の運動精子の割合、運動時間を観察した。

人工精漿は高橋ら¹⁾が考案した組成を用い、pHの調整は試験開始前に1N-NaOH、1N-HClを滴下混和して行った。

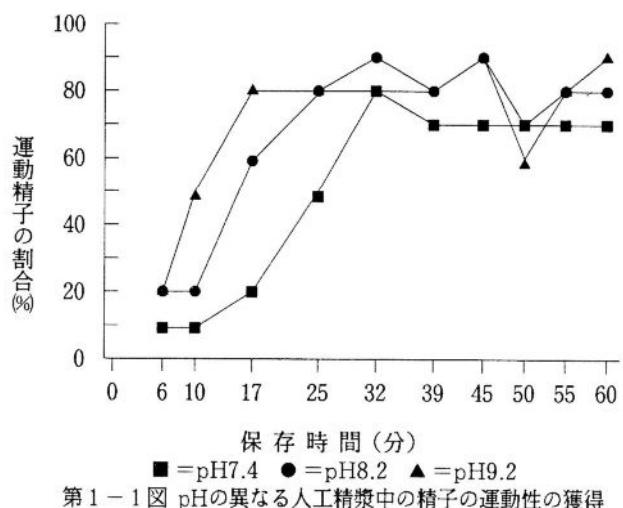
この試験の他に雌1尾から採卵した卵を0.5gずつ3等分し、前述のpHの異なった希釀精液0.05mlを用い、60分後に媒精した。受精卵の一部をスライドグラスに付着させて数時間後に着卵数を計数し、6日目に発眼率を調査した。

結果及び考察

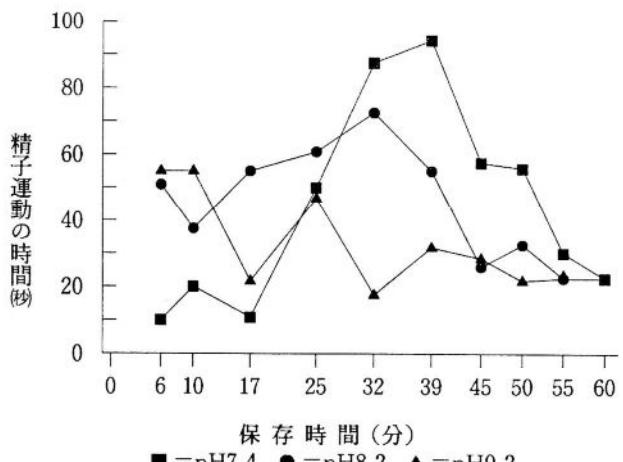
pHの異なる人工精漿中の精子の運動性の獲得状況のうち、運動精子の割合を第1-1図、精子の運動時間を第1-2図に示した。

搾出直後に運動性のない精液を人工精漿で希釀した場合、時間の経過とともに運動性のある精子の割合が増加し、pHによって異なる傾向が見られた。

pH9.2及び8.2の人工精漿中では、運動性の獲得時間に若干の差は見られるが、17～25分という比較的短時間で80%前後の割合を示した。pH 7.4の人工精漿中では前



第1-1図 pHの異なる人工精漿中の精子の運動性の獲得



第1-2図 pHの異なる人工精漿中の精子の運動性の獲得

二者とは異なり、運動性の獲得に若干時間がかかり、30～45分後で70～80%前後の割合を示した。

一方、精子の運動時間は三者三様の傾向を示した。

pH9.2の人工精漿中では、6分後に54秒であったが、時間の経過とともに運動時間が短くなる傾向を示した。

pH8.2の人工精漿中では、6分後に50秒間、32分後には71秒間であったが、その後運動時間は短くなった。

pH7.4の人工精漿中での運動時間は、6～17分後までは三者中一番短く10～20秒間であったが、32～39分後には86～92秒間と一番長くなった。その後の運動時間は、前二者同様短縮化する傾向を示した。なお、三者の1時間後の運動時間は22～23秒間であった。

pHの異なる希釀精液を用いて媒精した発眼率の結果を、第2表に示した。

各区の発眼率は、pH7.4区と8.2区は約90%、pH9.2区は約80%で前二者より若干低率ではあるが、三者とも良好な値であった。

以上のように、運動性のない搾出精液でも人工精漿を

第2表 pHの異なる人工精漿を用いたときの発眼率

項目 区分	発眼率 (%)	媒精時の精子の運動性	
		動く精子の割合	精子の運動時間
pH7.4	88.4	70%	23秒
pH8.2	89.2	80%	22秒
pH9.2	82.4	80%	22秒

用いることにより、運動性のある精子の割合が増加した。

前報²⁾において、人工精漿を用いた希釈精液が高い発眼率を示したのは、搾出直後に運動性のない精子が運動性を獲得したためと考えられる。

人工精漿のpHについては、7.4は希釈後40分、8.2は同25分、9.2は同17分間培養することにより、動く精子の割合が80%に達していることから、高橋ら¹⁾の考案したニジマス用の人工精漿(pH 8)をそのまま用いる場合は、希釈後25分間培養してから使用することにより、発眼率の向上、さらに効率的な採卵業務が期待できると考えられた。

試験－2 発眼率に及ぼす人工精漿のpHについて（精巣内精子）

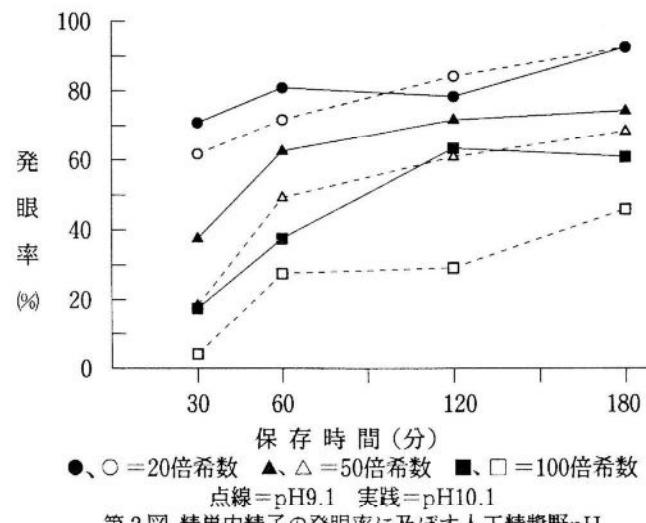
材料及び方法

長良川で採捕された親魚を雌雄1尾ずつ用いて、10月29日に試験を行った。完熟卵は0.3gずつ24区分した。

精巣内精子は輸精管を切除後、精巣をハサミにより細断し、pH9.1と10.1の人工精漿により重量換算で20倍、50倍及び100倍に希釈し、30分、60分、120分及び180分後にそれぞれの卵群を希釈精液0.03mlによって媒精した。媒精した卵の一部をスライドグラスに付着させ、数時間後に着卵数を計数後流水池(16.4°C)に収容し、6日後に発眼率を調査した。希釈精液と供試卵群は蓋付き滅菌シャーレに収容し、たらいに浮かべて水温を一定(17.4°C)に保った。なお、pHの調整は試験開始前に、1N-NaOHにより行った。

結果及び考察

結果は第2図に示したとおりで、20倍区、50倍区及び100倍区ともに希釈精液の保存時間が長くなるほど発眼



第2図 精巣内精子の発眼率に及ぼす人工精漿野pH

率は高くなった。また、希釈倍率が大きくなるにしたがって発眼率が低下する傾向が見られ、この要因として運動性のある精子の量が影響していると考えられた。

pHの影響については50倍区、100倍はいずれもpH10.1区が9.1区の発眼率を上回り、50倍区は1.1~2.1倍、100倍は1.3~4.9倍の発眼率を示したが、20倍区は前二者とは異なり、pHによる発眼率の差は特に見られなかった。

これらの結果から、希釈倍率が大きい場合はpH10が好ましく、人工精漿中で120分以上の培養を行う必要があると考えられる。一方、20倍希釈の場合は、pH 9またはpH10の人工精漿中で1時間以上の培養を図る必要があるが、採卵期終盤における有効な方法と考えられた。

要 約

1. 搾出直後の精液の活性と高橋らがニジマス用に考案した人工精漿を用い、搾出精液の人工精漿中の培養時間に伴う運動性の獲得及びpHの影響、また、精巣内精子の発眼率に及ぼす人工精漿のpH等について、検討を加えた。
2. 搾出直後の精液は、運動性のある精子とない精子をもつ個体が見られるが、運動性のある精子の割合と運動時間に相関は見られなかった。
3. 運動性のない搾出精液は、人工精漿で希釈することにより運動性を獲得した。その割合が80%になる培養時間は、pH9.2は17分、pH8.2は25分、pH7.4は39分後であった。
4. 精子の運動時間の最長時間は、pH7.4の人工精漿中では39分後に92秒間、pH8.2は32分後に71秒間、pH9.2は6分後に54秒間であった。

5. これらのこと及び前報の結果から、人工精漿を用いることにより、運動性のある精子の割合が増加することによって、発眼率が向上するものと考えられた。
6. 精巣内精子の希釈倍率は、20倍、50倍及び100倍とともに希釈精液の培養時間が長いほど発眼率が高くなり、また、希釈倍率が大きくなるほど発眼率が低下する傾向を示した。
7. 精巣内精子に用いる人工精漿のpHは、20倍希釈は9と10では発眼率に差は見られないが、50倍と100倍の場合は10が良好であった。
8. 高橋らの人工精漿を用いて、アユの人工受精を行う場合は、搾出精液を用いる方法と精巣内精子を用いる方法がある。前者は、比較的容易に精液が搾出可能な産卵期前半に、後者は搾出困難な産卵期後半に有効な方法と考えられた。
9. 搾出精液で媒精する場合には、高橋らの人工精漿(pH 8)を用いて、重量換算で20~50倍希釈後、25分間培養してから媒精する方法、精巣内精子で媒精する

場合には、人工精漿のpHを9又は10に調整し、重量換算で20倍希釈し、60分以上の培養後媒精する方法が、現時点では実用上最適であると考えられた。

文 献

- 1) 高橋一孝, 1984; マス類の染色体操作による飼育試験－1 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, 昭和59年度, 84~91.
- 2) 岡崎 稔・熊崎 博, 1995; 人工精漿によって希釈した精液の有効性. 岐水試研報, No.40.
- 3) 小林 徹, 1990; 性転換雄の精巣内精子に対する運動活性の向上について バイオテクノロジー実用化に関する検討. 醍井養鱒場事報, 昭和63年度, 29~33.