

アユの効率的な媒精技術の開発

受精液の使用による発生成績の改善

桑田知宣

Technical development of efficient insemination method in ayu, *Plecoglossus altivelis altivelis*

Improvement of development efficiency by insemination method using fertilization solution

TOMONORI KUWADA

一般にアユの媒精作業は乾導法により行われている。¹⁻³⁾ すなわち、腹部圧迫により採卵した卵に適量の精液を媒精し、混合した後に、水中で魚巢に着卵させながら受精させている。アユの精子は、Kイオンなどの精漿成分が薄まることにより運動を開始するため、⁴⁾ 従来の乾導法では着卵時に運動を開始するとされている。¹⁾ このとき精子は、多量の飼育水で希釈させることによってその密度が大幅に低下してしまう。この精子密度の大幅な低下は、全雌アユ作出時^{5,6)} のように低濃度精液を用いなくてはならない場合において、発生率の低下原因となる可能性がある。この問題を防ぐためには、着卵前に適量の受精液を加えて精子の運動開始を誘導することにより、運動開始時の精子密度を適正に保てば良いと考えられる。(以下、効率的な受精を目的として媒精から着卵までの間に加える液を受精液とする。) アユの受精液については、雌性発生魚作出時に生理食塩水を用いた事例⁷⁾ や全雌アユ作出時にコイ受精液を用いた事例⁵⁾ などの報告があるが、その使用方法や有効性を発生実験によって検証した報告は見あたらない。そこで本研究では受精液の有効性を発生実験により検証することを目的とし、1. 媒精から着卵までの経過時間と発眼率との関係(従来の乾導法における問題点の確認) 2. 受精液量と発眼率との関係 3. 受精液使用による発眼率の改善効果の確認について検討した。

キーワード：アユ、媒精、人工授精、受精液、発眼率、乾導法

方 法

実験1 媒精から着卵までの経過時間と発眼率との関係(乾導法における問題点の確認)

当所で種苗生産した雌アユに16IU/g(魚体重)の割合でヒト胎盤性生殖腺刺激ホルモン(以下、hcgとする)を投与して排卵を誘発させた。⁸⁾ hcg投与48時間後に腹部圧迫により排卵の有無を確認し、排卵済みの雌アユ5尾より採卵した卵を混合して実験に用いた。精液は、当所で種苗生産した雄アユ1尾より採精し、アユ精漿のイオン組

成⁹⁾に従って作製したアユ用人工精漿¹⁰⁾(130mM NaCl, 11.4mM KCl, 2.3mM CaCl₂, 0.6mM MgCl₂, 20mM NaHCO₃)で使用直前に500倍に希釈した。媒精後着卵までの経過時間が発眼率に及ぼす影響を評価するための媒精後保管区、媒精の有無を対比するための媒精前保管区、保管の有無について対比するための対照区を設けた。媒精後保管区：直径9cmのプラスチックシャーレに卵を0.5gずつ分取し、各シャーレの卵に希釈精液を50μLずつ媒精して攪拌し20°Cで保管した。媒精攪拌5、10、20、40、80分後に保管した媒精済みの卵を1Lの淡水中でスライドグラスに着卵させ

た。媒精前保管区：未媒精の卵をプラスチックシャーレに0.5gずつ分取し20℃で保管した。保管5、10、20、40、80分後にそれぞれ50 μ Lの希釈精液を媒精して攪拌し、攪拌10秒後に卵を1Lの淡水中でスライドグラスに着卵させた。対照区：採卵直後の未媒精の卵をプラスチックシャーレに0.5g分取し直ちに50 μ L希釈精液を媒精し10秒後に1Lの淡水中でスライドグラスに着卵させた。上記操作を1セットとし、同じ操作を3回繰り返して処理区ごとに3つの反復区を設けた。着卵作業終了後、各スライドグラスの着卵数を計数し、水温17℃の飼育水中で発眼まで管理した。なお、水カビ病による死亡を抑制するために3日おきに1mg/Lのマラカイトグリーンシュウ酸塩溶液による薬浴を行った。¹⁾ 発眼期に発眼している卵数を計数し、各区の発眼率（発眼卵数/着卵数）を求めた。全ての区の発眼率を逆正弦変換し、媒精前保管区と媒精後保管区のそれぞれについて、対照区とそれ以外の処理区の平均値の違いをDunnettの方法により有意水準5%で検定した。

実験2 受精液量と発眼率との関係

受精液を多量に用いた場合の影響について評価するための高希釈試験と最適受精液量を検討するための低希釈試験を実施した。卵は、排卵後の経過時間が24時間以内である雌アユより採卵し混合して用いた。精液は、当所産雄アユ1尾より採精した精液を使用直前にアユ用人工精漿で1000倍に希釈して用いた。

ア) 高希釈試験

プラスチックシャーレに卵を1gずつ分取し、希釈精液を100 μ L媒精し攪拌した。媒精攪拌10秒後に200、400、800、1600、3200、6400、12800 μ Lの人工血漿をそれぞれ加えて攪拌し、10秒後に1Lの淡水中でスライドグラスに着卵させた。同じ操作を再度繰り返して各処理区2つの反復区を設けた。

イ) 低希釈試験

プラスチックシャーレに卵を0.5gずつ分取し、希釈精液を50 μ L媒精し攪拌した。媒精攪拌10秒後に25、50、100、200、400 μ Lの人工血漿をそれぞれ加えて攪拌し、10秒後に1Lの淡水中でスライドグラスに着卵させ試験区とした。上記操作を1セットとし、同じ操作を3回繰り返して処理区ごとに3つの反復区を設けた。

着卵作業終了後から発眼までの卵管理および発眼率の調査は実験1と同じ方法で行った。受精液量と発眼率との関係について、高希釈試験についてはスピアマンの順位相関係数により有意水準5%で両側検定を行い、低希釈試験については2次多項式への回帰分析を行った。

実験3 受精液の使用による発眼率の改善効果の確認

hcg投与による排卵誘発、採卵、採精は実験1と同じ方法で行った。精液は、人工精漿で1000倍に希釈して用いた。プラスチックシャーレに卵を0.5gずつ分取し、希釈精液を50 μ L媒精して攪拌した。摂水時に動く精子の受精への寄与を明らかにするとともに受精液の使用による改善効果を確認するために次の5区を設けた。着卵時受精障害区：媒精攪拌10秒後に、1mLのアユ用人工精漿で卵を2度洗浄して精子を洗い流し、1Lの淡水中でスライドグラスに着卵させた。乾導法区：媒精攪拌10秒後に1Lの淡水中でスライドグラスに着卵させた。受精液1区：媒精攪拌10秒後に受精液としてアユ人工血漿(124mM NaCl, 2.9mM KCl, 3.4mM CaCl₂, 0.7mM MgCl₂) 100 μ Lを加え、さらに10秒後に1Lの淡水中でスライドグラスに着卵させた。受精液2区：媒精攪拌10秒後に受精液としてBuffered Solution(20mM HEPES-NaOH, pH7.5)100 μ Lを加え、さらに10秒後に1Lの淡水中でスライドグラスに着卵させた。対照区：精子原液を50 μ L媒精し攪拌10秒後に1Lの淡水中でスライドグラスに着卵させた。上記5区を1セットとし、同じ操作を5回繰り返して処理区ごとに5つの反復区を設けた。着卵作業終了後から発眼までの卵管理および発眼率の調査は実験1と同様の方法で行った。全ての区の発眼率を逆正弦変換し、各処理区間の平均値の違いをTukey-HSD法により有意水準5%で検定した。

結 果

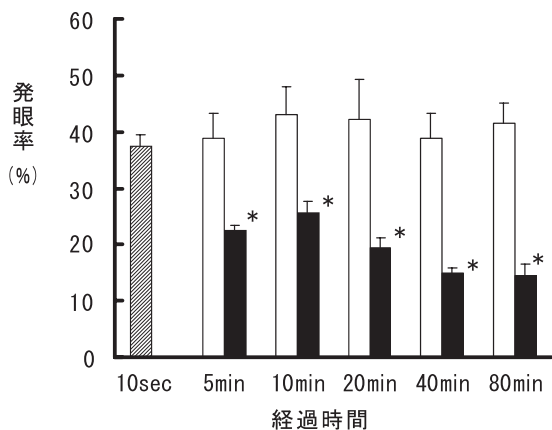
実験1 媒精から着卵までの経過時間と発眼率との関係

媒精から着卵までの経過時間と平均発眼率との関係について第1図に示した。媒精後保管区では媒精から着卵までの経過時間に伴って発眼率が低下し、各処理区の平均発眼率(14.4~25.6%)は、いずれも対照区の平均発眼率(36.7%)より有意に低かった。一方、希釈精液と卵を別々に保管し着卵直前に媒精した媒精前保管区では、各処理区の平均発眼率(37.6~41.7%)はいずれも対照区の平均発眼率(36.7%)との間に有意な差が認められず、時間経過にともなう発眼率の低下は確認されなかった。

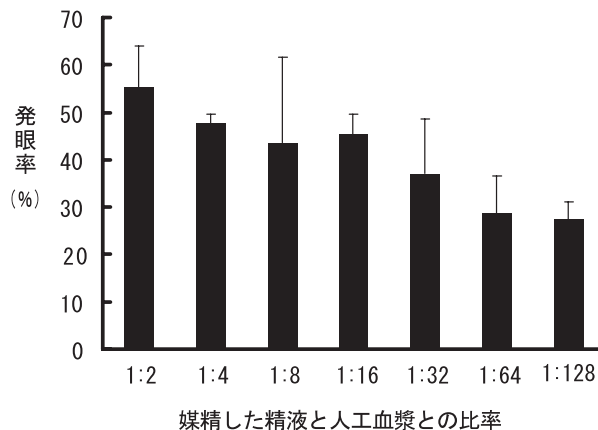
実験2 受精液量と発眼率との関係

ア) 高希釈試験

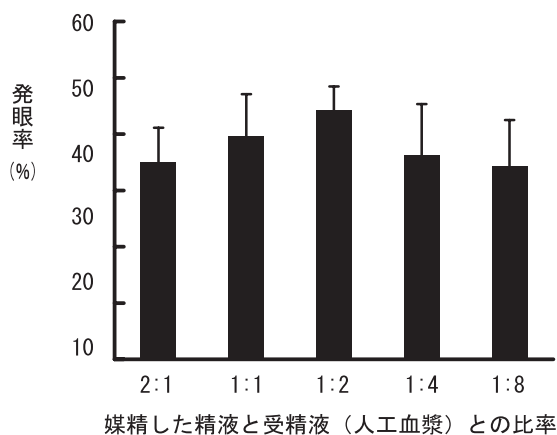
精液量に対する受精液量の比率と平均発眼率との関係について第2図に示した。精液に対して2倍量の受精液(人工血漿)を加えた区の平均発眼率は55.3%であったが、加える受精液の量が4、8、16、32、64、128倍と増えるに



第1図 媒精から着卵までの経過時間と発眼率の関係
 ▨:対照区 □:媒精前保管区 ■:媒精後保管区
 垂線は3回の繰り返しによる平均値と標準誤差を表す。
 アスタリスクは対照区との間に有意な差があることを表す($p < 0.05$)。



第2図 精液量に対する受精液の比率と発眼率との関係 (高希釈試験)
 垂線は2回繰り返しによる平均発眼率と標準誤差を表す。



第3図 精液量に対する受精液量の比率と発眼率との関係
 垂線は3回繰り返しによる平均発眼率と標準誤差を表す。

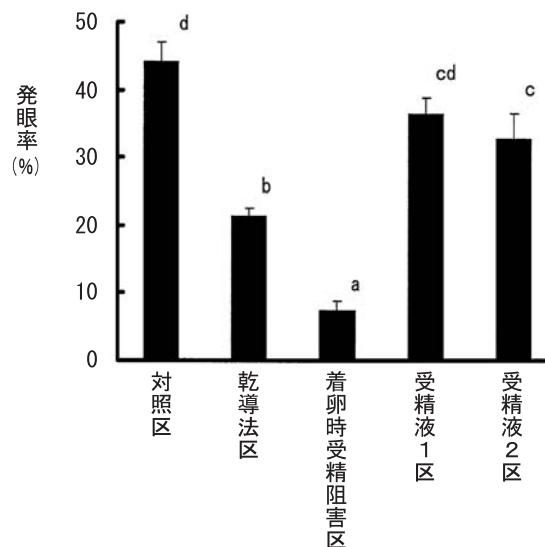
従って、平均発眼率は39.8%、32.4%、34.8%、28.3%、24.2%、21.7%と漸次減少した。受精液量と発眼率の間には有意な負の相関が認められた (スピアマンの順位相関係数 $r_s = -0.66$, $n = 14$, $p < 0.05$)。

イ) 低希釈試験

媒精した精液量と受精液量の比率と平均発眼率との関係について第3図に示した。精液量に対して2倍の受精液量を加えた区の平均発眼率が44.2%と最も高く、この比率から離れるほど各区の平均発眼率は低下した。しかし、受精液量と発眼率との間に有意な関係式は見いだされなかった。

実験3 受精液の使用による発眼率の改善効果の確認

媒精方法の違いによる平均発眼率の違いについて第4図



第4図 媒精方法の違いによる発眼率の違い
 垂線は5回繰り返しによる平均値と標準誤差を表す。
 同じアルファベット記号間には有意差がないことを示す ($p < 0.05$)。

に示した。着卵前に人工精漿で精子を洗い流して着卵時の受精を阻害した着卵時受精阻害区においても低率ながら発眼卵が得られた。しかし、着卵時受精阻害区の平均発眼率 (7.5%) は、着卵時の受精を阻害しなかった乾導法区の平均発眼率 (21.4%) より有意に低かった。一方、受精液を使用した受精液1区および受精液2区の平均発眼率はそれぞれ36.6%および32.8%と乾導法区の平均発眼率 (21.4%) より有意に高かった。受精液2区の平均発眼率は受精液1区のそれより高かったが、両者の間に有意差は認められなかった。対照区の平均発眼率 (44.3%) は、

受精液1区を除いた全ての区の平均発眼率より有意に高かった。

考 察

媒精方法の改善効果を検討するためには、受精率を比較するのが最も直接的であるが、アユ卵の受精率を調べるのは容易ではないため、本研究では発眼率による評価を行った。この場合、受精以後に生じる死亡のバラツキが大きいと媒精方法を評価することが出来なくなるため、本研究では、各区の卵管理を同一条件で行うとともに、マラカイトグリーンによる薬浴¹⁾を行って水カビ病を抑制した。実際に全ての区で水カビの発生は抑制されたため、解析結果を歪めるような受精後の死亡はなかったと考えられる。

媒精されたアユ精液はまず卵とともに排出された雌由来の体腔液で希釈される。その際、一部の精子は運動を開始するが、それらの受精への関与については明らかにされていない。媒精後の精子を人工精漿で洗い流して着卵時の受精を阻害しても発眼卵が得られること(第4図)から、媒精時に運動する精子は一部の卵の受精に関与していると考えられる。一方、着卵時の受精を阻害すると阻害しなかった区に比べて発眼率が有意に低下すること(第4図)により、従来から指摘されているように着卵時に運動する精子も受精に関与しており、時系列から考えて最終的にはそれらが発生成績を左右していると考えられる。実験2の高希釈試験の結果が示すように、受精液の量が多いほど、言い換えれば運動開始時の精液の希釈比率が高いほど発眼率は低下する。従って、着卵時に大量の飼育水により精液が大幅に希釈されてしまう従来の乾導法は、効率的な方法ではないと考えられる。そこで本研究では、受精液を用いて適正な密度で精子の運動開始を誘導することにより受精率の向上を図った。受精液を使用した区の発眼率は、受精液を用いずに着卵させた区(従来の乾導法)より有意に高いこと(第4図)により、受精液を使用した乾導法は、受精液を用いない従来の乾導法に比べて精子を効率的に受精させることが出来ると考えられる。

媒精後の卵を5分間保管すると有意に発眼率が低下すること(第1図)により、媒精後は、速やかに着卵させなければならないことが明らかになった。未媒精卵と精液を別々に保管した場合にはこのような発眼率の低下が生じないこと(第1図)により、この発眼率の低下は媒精が引き金となって生じることが分かる。採卵した卵には10%/

W程度の体腔液が含まれており、媒精された精液はまずこの体腔液で希釈される。次に体腔液と混合された精液は着卵時に淡水によって希釈される。この状態を再現するために、希釈精液と体腔液を等量ずつ混合し、その混合液をBuffered Solutionで希釈して経時的に精子の運動を観察すると、混合後の時間経過に伴って運動する精子の割合は低下し、運動時間が短くなる(桑田 未発表)。この観察結果は、媒精された精子の運動能が時間経過に伴って、低下することを示している。このような媒精後に起こる精子の運動能の低下が媒精後の時間経過に伴う発眼率の低下原因であると考えられる。媒精後に速やかに着卵させないと発生率が低下することは、通常の種苗生産においても知られている。³⁾種苗生産時にはおよそ100~200g程度の卵をまとめて採卵し、精液媒精後、卵を順次飼育水中で着卵器材に付着させる。¹⁻³⁾このとき全ての卵を付着させるためには5分程度の時間が必要であるため、着卵作業の時間経過に伴う発眼率の低下を完全に回避することは難しい。一方、媒精後直ちに受精液を加えれば、時間経過に伴う発眼率低下の影響を最小にすることが出来ると考えられるため、この点からも受精液の使用は有効であると考えられる。

以上のとおり、低濃度希釈精液を用いる場合には、受精液の使用により従来の乾導法に比べて発生成績を向上させられることが明らかになった。1000倍に希釈した精液を用いた場合においても受精液を使用すれば精子原液を用いた場合と遜色のない発眼率が得られることから(第4図)、性転換雄アユ精液を用いて全雌アユの作出を行う場合⁶⁾や雌性発生を行う場合⁷⁾のように希釈した精液を用いなくてはならないケースにおいて、受精液の利用は有用であると考えられる。一方通常は、本研究で用いたような低濃度の精液を用いて種苗生産が行われることはない。十分に精子濃度が濃い場合には、着卵時の大幅な希釈が受精の良否に影響を与えないかもしれない。しかし、通常の種苗生産過程においても着卵に時間をかけると発生率が低下することが経験的に知られており、³⁾受精液を用いることによりこの問題も回避できることを考慮すると、受精液の利用は通常の種苗生産においても作出成績の安定に寄与すると考えられる。なお、本研究結果において最も作出成績が良好であった条件は、媒精後直ちに、媒精した精液の2倍量の人工血漿を受精液として加え速やかに攪拌した場合であり、現在までのところ受精液の適用はこの条件で行うのがよいと考えられる。

要 約

1. 低濃度精液を用いた場合の効率的な媒精技術の開発を目的とし、発生実験によって媒精から着卵までの経過時間と発眼率との関係・受精液量と発眼率との関係・受精液使用による発眼率の改善効果の確認について検討した。
2. 媒精後の精子を人工精漿で洗い流して着卵時の受精を阻害すると有意な発眼率の低下が確認されたことより、媒精時だけではなく着卵時も重要な受精機会であることが明らかになった。
3. 未媒精卵と精液を一定時間放置して媒精した場合には発眼率の低下が確認されなかったにもかかわらず、媒精後の卵を同様に放置した場合には5分後に有意に発眼率が低下したことより、媒精後は速やかに摂水させなければならないことが明らかになった。
4. 精液と受精液の比率が2~128倍の範囲では、受精液量と発眼率との間に有意な負の相関が認められ、受精液による希釈が大きいほど発生成績は低下することが確かめられた。
5. 受精液を用いた場合の発眼率は従来の乾導法（受精液未使用）による発眼率より有意に高く、低濃度精液を用いる場合には受精液を用いるのが効率的であることが明らかになった。

文 献

- 1) 岐阜県, 水資源開発公団. 採卵とふ化 第II章 調査結果. アユの人工種苗生産技術-アユ人工種苗生産試

験調査事業の集成- 1983;27-35.

- 2) 兵庫県立水産試験場. アユ種苗生産マニュアル兵庫県水試種苗生産マニュアルシリーズ I. 1994.
- 3) 吉澤和俱. アユ. 水産増養殖システム 淡水魚(隆島忠夫, 村井 衛編), 恒星社厚生閣, 東京. 2005;83-101.
- 4) 辻 将治, 池田和夫, 太田博巳. アユ精子の運動開始を導くイオン環境の変化. 日水誌 2000;66(1):55-61.
- 5) 桑田知宣. 全雌アユ種苗の量産化技術の開発とその実用化の現状. 海洋と生物 2008;178:664-669.
- 6) 桑田知宣. 全雌アユの生産技術を確立. 養殖 2003;40(2):78-81.
- 7) Taniguchi N, Kijima A, Fukai J, Inada Y. Conditions to induce triploid and gynogenetic diploid in Ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 1986;52(1):49-53.
- 8) Hirose K. Effects of repeated injections of human chorionic gonadotropin(HCG) on ovulation and egg qualities in the Ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 1980;46(7):813-818.
- 9) Morisawa M, Suzuki K, Morisawa S. Effects of potassium and osmolality on spermatozoan motility of salmonid fishes. *J. Exp. Biol.* 1983;107:105-113.
- 10) Ohta H, Unuma T, Tsuji M, Yoshioka M, Kashiwagi M. Effects of bicarbonate ions and pH on acquisition and maintenance of potential for motility in ayu, *Plecoglossus altivelis* Temminck et Schlegel (Osmeridae), spermatozoa. *Aquacult. Res.* 2001;32:385-392.