

## アユの効率的な媒精技術の開発－Ⅱ

### 低濃度の卵巣腔液による卵の粘着抑制

桑田知宣

Technical development of efficient insemination method in ayu  
(*Plecoglossus altivelis altivelis*)

Ovelian fluid inhibits activation of egg adhesiveness from low concentration

TOMONORI KUWADA

粘着沈性卵であるアユ卵は外卵膜が反転して粘着器となり(岩井, 1992), 水に接すると他物に付着する(岐阜県・水資源開発公団, 1983)。種苗生産の際には, アユ卵のこの特性を活用して着卵基質(シュロ製の魚巢など)にアユ卵を付着させて管理している(岐阜県・水資源開発公団, 1983; 兵庫県水産試験場, 1994; 吉澤, 2005)。卵の粘着性は, 魚巢を用いた卵管理を行う上では有用であるが, 誤った操作で発現させると, しばしば卵の発生成績の低下をまねく。具体的には, 採卵時に卵に誤って淡水が混入した場合に, 受精前の卵が塊になってしまうことなどが上げられる。このため従来からアユの人工授精作業の主流は, 淡水への摂水を着卵まで避けることができる乾導法であった(岐阜県・水資源開発公団, 1983; 兵庫県水産試験場, 1994; 吉澤, 2005)。乾導法では, 着卵時にも精子が運動を開始し, 最終的な受精成績はこのとき決まる(桑田, 2009)。受精を促す観点から考察すると, このとき乾導法では, 運動精子が広く飼育水中に拡散してしまうため効率が悪い。この問題を解決するために受精液を用いる人工授精方法が開発され, その有効性が明らかにされている(桑田, 2009)。媒精容器という限られた空間の中で精子の運動を促すことが出来るこの方法は, 卵門まわりの運動精子の密度を高く保つことが出来るため, 効率的に受精させられると考えられる。しかし一方で, 受精液の添加によって卵が粘着性を発現し, 卵塊が生じることが懸念されている(岐阜県・水資源開発公団, 1983)。このように人工授精の成否は, 卵の粘着性を発現させることなく, 如何に効率よく精子を運動させるかに係っているため, 精子の運動開始条件だけではなく, アユ卵の粘着性の発現条件についても明らかにする必要がある。また, 前述のように着卵作業においては, 確実にアユ卵を着卵器材に付着させる必要があり, そのためにもアユ卵の粘着性の発現条件の解明が必要である。これまでに, アユ卵に混入している卵巣腔液が卵の粘着抑制作用を有するため, 受精液には卵の粘着防止機能は必要ないことを確認している(桑田, 2008)。しかし, アユの卵巣腔液が粘着抑制作用を発揮する濃度やその原因物質は明らかではない。そこで本研究では, 卵巣腔液のアユ卵粘着抑制作用濃度について実験的に検証するとともに, 人工授精作業時および着卵作業時の卵巣腔液濃度を試算することにより, 卵巣腔液の粘着抑制作用が両作業結果に及ぼす影響について考察した。また, 粘着を抑制する原因物質探索の糸口を得るために, アユの血清成分および他魚種(*Oncorhynchus masou ishikawae*)の卵巣腔液によるアユ卵粘着抑制作用についても調べた。

キーワード: アユ, 卵巣腔液, 粘着沈性卵, 粘着性の抑制, 人工授精

## 方 法

### 実験 1：アユ卵巢腔液によるアユ卵の粘着抑制作用

#### 卵巢腔液を希釈した供試卵の調整

本所で継代している海産系人工産アユ 3 尾より採卵した卵を混合して試験に用いた。2 本の遠沈管にそれぞれ 10 g 程度の卵を測り（卵重量）、800G、10 分間の遠心により卵と卵巢腔液を分離した。上澄みとして分離した卵巢腔液をマイクロピペットで出来る限り回収して重量を測定し、その平均値から採卵した卵に含まれる卵巢腔液の重量比（卵巢腔液重量／卵重量×100）を算出したところ 17.4 であった。同じ採卵ロットから遠沈管に 10 g 程度の卵を測り取り、卵巢腔液比（1.74）からその中に含まれる卵巢腔液量を算出し、卵巢腔液の濃度が重量換算で 10% となるように Buffered Solution（20mM HEPES-NaOH, pH7.5）（以下 BS とする）を加えた。攪拌後に 10% 希釈卵巢腔液が 3ml 残るように余分な液を測り取った。更に 12ml の BS を加えて卵巢腔液の最終的な希釈濃度が 2% となるように調整して攪拌後、1 時間静置し余分な希釈卵巢腔液を出来る限り捨てた。

#### 各種溶液によるアユ卵の粘着抑制能の評価

上記により卵巢腔液を 2% に希釈した卵を 9cm プラスチックシャーレに 0.2 g ずつ分取した。分取した卵にそれぞれ BS、アユ人工血漿（124mM NaCl, 2.9mM KCl, 3.4mM CaCl<sub>2</sub>, 0.7mM MgCl<sub>2</sub>, 20mM HEPES-NaOH, pH7.5）（太田ほか, 2001）（以下人工血漿とする）、シシャモ人工生殖腔液（120.4mM NaCl, 4.8mM KCl, 1.8mM CaCl<sub>2</sub>, 0.8mM MgCl<sub>2</sub>）（太田ほか, 1995）（以下人工卵巢腔液とする）、人工卵巢腔液を BS で希釈した 5%、10%、25%、50% 人工卵巢腔液希釈液（アユ人工卵巢腔液区）およびアユ卵巢腔液を BS で希釈した 0.25%、0.5%、1%、2.5%、5% アユ希釈卵巢腔液（アユ卵巢腔液区）を 10ml ずつ加え、全 12 区を設定した。各シャーレをそのまま静置し 12 時間後に各区のシャーレに付着した卵と付着しなかった卵をそれぞれ計数して着卵率（粘着した卵数／供試卵数×100）を求め、各溶液によるアユ卵の粘着性抑制能を評価した。

### 実験 2：アユ血清とアマゴ卵巢腔液による粘着抑制作用

アユ卵巢腔液以外にアユ卵の粘着抑制効果がある液体の有無を調べるため、アユの血清成分とアマゴの卵巢腔液について調査した。

#### 材料

成熟したアユ雌魚の尾柄部より注射器により血液を採取し、4℃で一晩静置後、15,000G で 10 分間遠心し、その上清液をアユ血清とした。採取したアユ血清は試験まで

-30℃で保存した。アマゴ卵巢腔液は下呂支所で継代飼育しているパー系アマゴより採取した。採卵時に卵とともに排出される卵巢腔液を目合い 2mm の金ザルで濾過して採取し、試験まで-30℃で保存した。アユ卵巢腔液は前試験と同じ方法で採取し試験まで-30℃で保存した。アマゴ卵巢腔液とアユ卵巢腔液の遠心履歴をアユ血清と揃えるために、解凍後の両液を 15,000G で 10 分間遠心し、その上清液を以下の試験に用いた。

#### 卵巢腔液を希釈した供試卵の調整

本所で継代している海産系人工産アユ 10 尾より採卵して混合したアユ卵の卵巢腔液の重量比を前試験と同じ方法で測定したところ 12.6 であった。この重量比を基にして前試験と同じ方法で卵巢腔液の濃度を 2% に希釈した。

#### 各種溶液によるアユ卵の粘着抑制能の評価

上記により卵巢腔液を 2% に希釈した卵を 9cm プラスチックシャーレに 0.2 g ずつ分取した。BS、人工血漿、人工卵巢腔液を各 10mL ずつプラスチックシャーレに加えて BS 区、人工血漿区、人工卵巢腔液区とした。アユ卵巢腔液、アユ血清、アマゴ卵巢腔液をそれぞれ 0.25%、0.5%、1%、2.5%、5% に希釈して、各 10ml をプラスチックシャーレに加え、0.25%、0.5%、1%、2.5%、5% アユ卵巢腔液区、0.25%、0.5%、1%、2.5%、5% アユ血清区、0.25%、0.5%、1%、2.5%、5% アマゴ卵巢腔液区とした。また、人工血漿により 1% に希釈したアユ卵巢腔液希釈液 10 mL をプラスチックシャーレに加えて ABP-卵巢腔液区とした。12 時間後に各区のシャーレに付着した卵と付着しなかった卵をそれぞれ計数して着卵率を求め、各溶液によるアユ卵の粘着抑制能を評価した。

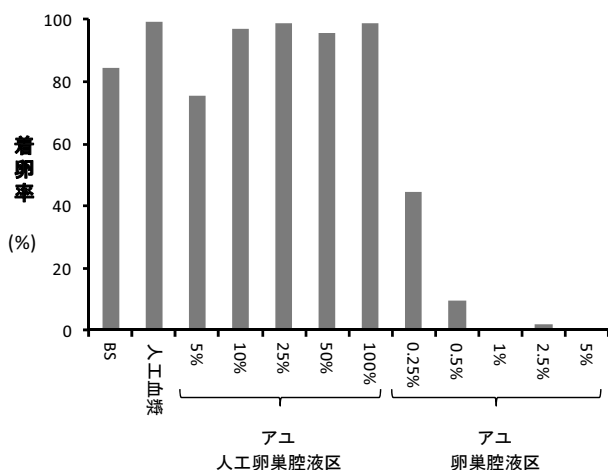
#### 統計処理

人工卵巢腔液、アユ卵巢腔液、アユ血清、アマゴ卵巢腔液の濃度と着卵率との関係について、Spearman の順位相関係数の無相関検定により検定した。アユ卵巢腔液区の着卵とアユ血清区またはアマゴ卵巢腔液区との着卵率の違いについて、各区の着卵率を逆正弦変換後、paired t-test により検定した。

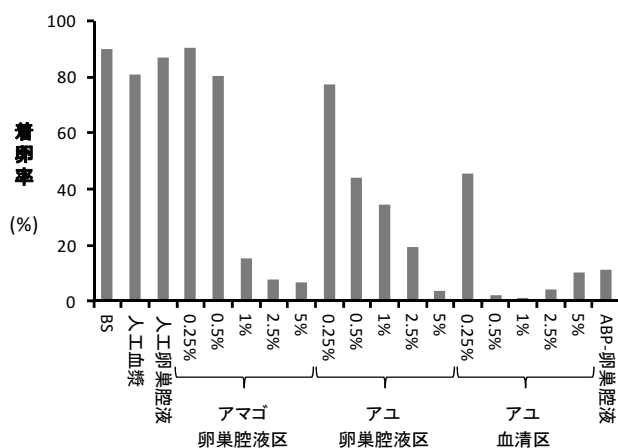
## 結 果

### 実験 1：アユ卵巢腔液によるアユ卵の粘着抑制作用

各区の 12 時間後の着卵率を第 1 図に示した。アユ卵巢腔液を加えていない BS、人工血漿、5%、10%、25%、50%、100% 人工卵巢腔液を加えた区の着卵率はそれぞれ 84.3%、99.0%、98.6%、95.8%、98.6%、97.1%、75.6% といずれも高く、人工卵巢腔液の濃度と着卵率との間に



第1図 各種溶液中で保管したアユ卵の着卵率



第2図 各種溶液中で保管したアユ卵の着卵率

も有意な関係は認められなかった (Spearman の順位相関  $t=1.0$ ,  $df=3$ ,  $P=0.39$ )。一方、アユの卵巣腔液が含まれている 0.25%, 0.5%, 1%, 2.5%, 5%アユ卵巣腔液区の着卵率はそれぞれ 44.6%, 9.7%, 0.7%, 2%, 0%と低く、卵巣腔液の濃度が高いほど着卵率が低い傾向が認められた (Spearman の順位相関  $t=3.58$ ,  $df=3$ ,  $P<0.05$ )。

#### 実験 2. アユ血清とアマゴ卵巣腔液による粘着抑制作用

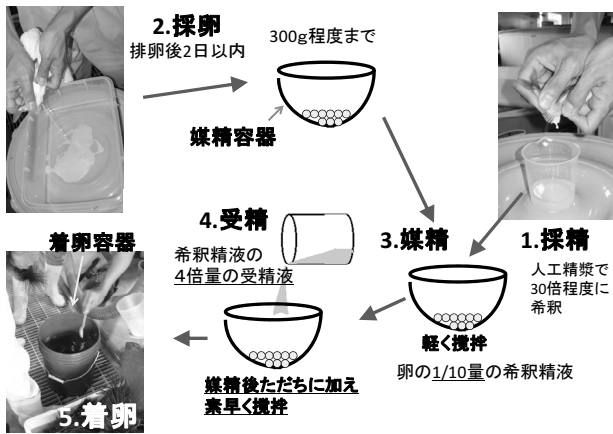
各区の 12 時間後の着卵率を第 2 図に示した。アユ卵巣腔液を加えていない BS 区, 人工血漿区, 人工卵巣腔液区の着卵率はそれぞれ 89.6%, 80.6%, 86.8%といずれも高かった。一方、アユの卵巣腔液が含まれている 0.25%, 0.5%, 1%, 2.5%, 5%アユ卵巣腔液区の着卵率はそれぞれ 77.3%, 44.1%, 34.5%, 19.4%, 3.7%となり、卵巣腔液の濃度が高いほど着卵率が低い傾向が認められた (Spearman の順位相関  $t=\infty$ ,  $df=3$ ,  $P<0.01$ )。また、5 つのアユ卵巣腔液の平均着卵率は 35.8%であった。

アユの血清が含まれている 0.25%, 0.5%, 1%, 2.5%, 5%アユ血清区の着卵率はそれぞれ 45.4%, 2.4%, 1.2%, 4.1%, 10.0%となり、その平均着卵率は 12.7%とアユ卵巣腔液区のそれより低い値であったが、両区の違いは有意ではなかった (paired  $t$ -test,  $t=2.72$ ,  $df=4$ ,  $P=0.053$ )。アマゴの卵巣腔液が含まれている 0.25%, 0.5%, 1%, 2.5%, 5%アマゴ卵巣腔液区の着卵率は、それぞれ 90.5%, 80.3%, 15.3%, 7.8%, 6.9%となり、アマゴ卵巣腔液の濃度が高いほど着卵率が低い傾向が認められた (Spearman の順位相関  $t=\infty$ ,  $df=3$ ,  $P<0.01$ )。5 つのアマゴ卵巣腔液の平均着卵率は 40.2%であった。アマゴ卵巣腔液区とアユ卵巣腔液区の着卵率の違いに有意差はなく (paired  $t$ -test,  $t=0.71$ ,  $df=4$ ,  $P=0.514$ )、アマゴ卵巣腔液もアユ卵巣腔液と同様にアユ卵の粘着性発現を抑制することが明らかになった。

## 考 察

本研究では採卵したアユ卵に BS を加えて、卵巣腔液を 2%に希釈した卵を調整し着卵実験に用いた。この卵は各種溶液を加えるまでプラスチックシャーレに付着しなかったが、BS, 人工卵巣腔液, 人工血漿など卵巣腔液の含まれていない溶液を加えると粘着性を発現した。従って、卵巣腔液はアユ卵の粘着性を除去するのではなく、アユ卵の粘着性の発現を抑制していると考えられる。

0.25%~5%濃度のアユ卵巣腔液の粘着性抑制能を調べた両実験において、アユ卵巣腔液の濃度が高いほど有意に着卵率が低下する傾向が認められたことより、アユ卵巣腔液は濃度依存的にアユ卵の粘着性発現を抑制することが明らかになった。また、両実験で 5%濃度のアユ卵巣腔液は 100%または 96.3%のアユ卵の着卵を抑制したのに対して、0.25%濃度のアユ卵巣腔液は、55.4%または 11.6%のアユ卵しか着卵を抑制できなかったことより、アユ卵の粘着性を確実に抑制するための濃度境界は 0.25~5%の間にあると考えられる。これらを考慮して人工授精作業時の卵巣腔液の濃度を試算することにより、受精液の使用によるアユ卵の粘着性発現の可能性について以下に検証した。当所が奨励している受精液を用いたアユの人工授精作業手順を第 3 図に示した。この作業手順に従った場合、受精液量は卵量の 40%となる。採卵重量に対する卵巣腔液量の重量比は、前述のとおり 12.6%と 17.4%であったことから、卵には重量換算で概ね 15%程度の卵巣腔液が含まれていると考えられる。この場合、受精液を入れた際の卵巣腔液の希釈倍率は 3.7 倍 (卵巣腔液濃度 27%) と



第3図 受精液を用いた人工授精方法の手順

試算される。この試算濃度はアユ卵の粘着性発現を抑制するには十分な濃度であるため、この作業手順に従えば、粘着抑制作用を持たない飼育水や人工血漿などを受精液に用いても、媒精容器の中でアユ卵が粘着性を発現することはないと考えられる。ただし、局所的に卵巣腔液濃度の低下が生じれば、アユ卵は粘着性を発現すると考えられるため、受精液を加える時には、十分な攪拌が必要となる。

一般にアユ卵はシュロ製の魚巢などへ付着させて管理されており（岐阜県・水資源開発公団，1983；兵庫県水産試験場，1994；吉澤，2005），着卵作業は飼育水を入れたバケツの中などの着卵容器内で行なわれている（岐阜県・水資源開発公団，1983）。このとき容器内の飼育水を交換することなく繰り返し着卵作業を行うとしばしば着卵しにくくなるのが経験的に知られている。着卵容器内の飼育水には、着卵作業に伴って卵と一緒に卵巣腔液が混入する。卵巣腔液は、アユ卵の粘着性発現を強く抑制することから、繰り返し着卵作業を行った時の着卵阻害の原因は、卵巣腔液の濃度上昇である可能性が考えられる。そこで着卵作業時の卵巣腔液濃度を試算してそのリスクを以下に検証した。卵巣腔液重量比が15%のアユ卵を容量15Lのバケツを用いて着卵させる場合を想定すると、250gのアユ卵を着卵させた時の着卵容器内の飼育水に含まれる卵巣腔液の濃度は0.25%に達する。これは一部のアユ卵の粘着性発現が抑制される濃度である。従って、着卵作業時には卵巣腔液の濃度上昇に注意して、定期的に着卵容器内の飼育水を交換しなくてはならないと考えられる。

卵巣腔液のどの成分がアユ卵の粘着性を制御しているのかは興味深い問題である。アユの卵巣腔液だけでなく、アユの血清もアユ卵の粘着性の発現を抑制したことより、原因成分は、卵巣腔液と血清に共通して含まれると考えられる。サケ科魚類では、体腔液（＝卵巣腔液）は、血液か

らの漿液成分の移動（松原ほか，1987；1994），および体腔上皮細胞と卵巣懸膜上皮細胞からの体腔液特異成分の分泌（Matsubara et al., 1985；1993）によって産生され、卵巣腔液のイオン組成や浸透圧は概ね血漿と類似していること（Hirano et al., 1978）が報告されている。これを考慮するとまず卵巣腔液および血漿に共通する構成イオンや浸透圧が粘着性抑制の原因として想定される。しかし、これらとイオン組成が近い人工卵巣腔液や人工血漿がアユ卵の粘着性の発現を全く抑制しないこと、人工卵巣腔液の濃度変化が粘着性の発現に影響しないことから、少なくとも卵巣腔液の主要な構成イオンや浸透圧はこの原因ではないと考えられる。一方、卵巣腔液と血清の両方がアユ卵の粘着性の発現を抑制するという結果は、それを制御する成分が卵巣腔液に特異的な成分ではなく、漿液由来であることを示唆している。興味深いことに、わずかの差で有意差は認められなかったものの、アユ血清区の着卵率の平均値（12.7%）はアユ卵巣腔液の平均値（35.8%）より低い値となり、血清のほうが卵巣腔液よりも強くアユ卵の粘着性の発現を抑制した。松原ら（1994）は、サクラマスの血中に哺乳類由来のアルブミンを注射して同成分の体腔液への移行について調べ、ほ乳類由来のアルブミンは体腔液に移行するものの、その濃度は最大でも血清中の3%と低かったことを報告している。また、同報告の中で松原ら（1994）は、体腔液中の蛋白質濃度は血清値の約12.4%と低いことも明らかにしている。このように卵巣腔液には血漿成分の移動により多種の血清蛋白質等が含まれるが、卵巣腔液中の成分量は必ずしも血漿中の成分量と同じ量にはならない。このことを考慮すると、血清が卵巣腔液よりも強くアユ卵の粘着性の発現を抑制するという一見矛盾した結果も、その原因成分が漿液由来であると仮定することにより、整合的に解釈することができる。更に興味深いことに、不付着卵を産むアマゴ（岩井，1992）の卵巣腔液もアユの卵巣腔液と同様にアユ卵の粘着性の発現を抑制することが明らかになった。本研究で得られたこれらの知見を総合すると、アユ卵の粘着性の発現を制御する成分は、卵の粘着特性に係わらず種を超えて漿液中に共通して存在する成分である可能性が高い。今後は、この条件を手がかりにして血清成分の中から条件に合う原因成分を探索し、その添加効果を調べる必要がある。

## 要約

1. アユ卵の効率的な媒精・着卵技術を開発するために、卵巣腔液によるアユ卵の粘着性の発現抑制作用について

て調べた。

2. pH調整した蒸留水 (BS) , アユ人工血漿, シシャモ人工生殖腔液は, それ単独ではアユ卵の粘着性の発現を抑制しなかった。
3. アユ卵巣腔液は, アユ卵の粘着性の発現を強く抑制する作用を有し, 5%濃度で95%以上のアユ卵の着卵を, 0.25%濃度でも一部のアユ卵の着卵を抑制することを明らかにした。
4. アユの卵巣腔液だけではなく, アユの血清やアマゴの卵巣腔液もアユ卵の粘着性の発現を強く抑制することを明らかにした。
5. 受精液を用いた人工授精作業における卵巣腔液の濃度を試算することにより, 粘着抑制作用がない受精液であっても, 量を適切に調整すればアユ卵の粘着による問題が生じないことを裏付けた。
6. 着卵作業時の卵体腔液の濃度の試算により, 着卵作業時の卵体腔液濃度の上昇は, シュロ製の魚巢などへのアユ卵の着卵阻害要因に成り得ることを明らかにした。

## 文 献

- 岐阜県・水資源開発公団. 1983. 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. 岐阜県・水資源開発公団, 岐阜. 27-35 pp.
- Hirano, T., M. Morisawa and K. Suzuki. 1978. Changes in plasma and coelomic fluid composition of the mature salmon (*Oncorhynchus keta*) during freshwater adaptation. *Comp. Biochem. Physiol.*, 61: 5-8.
- 兵庫県立水産試験場. 1994. アユ種苗生産マニュアル 兵庫水試種苗生産マニュアルシリーズ I. 兵庫県立水産試験場, 兵庫. 14-16 pp.
- 岩井保. 1992. 水産脊椎動物 II 魚類. 恒星社厚生閣, 東京. 213-214 pp.
- 桑田知宣. 2008. 全雌アユ種苗の量産技術の開発とその実用化の現状. *海洋と生物*, 178(30): 664-669.
- 桑田知宣. 2009. 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. 岐阜県河川環境研究所研究報告, 54: 1-5.
- Matsubara, T., A. Hara and K. Takano. 1985. Immunochemical identification and purification of coelomic fluid-specific protein in chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 81: 309-314.
- 松原孝博, 伊藤文成, 原彰彦, 高野和則. 1987. 採卵後のサクラマスに見られた体腔壁内面の水腫様膨隆: 特に体腔液産生とのかかわりについて. *北海道大学水産学部研究彙報*, 38: 349-357.
- Matsubara, T., A. Hara and K. Takano. 1993. Immunohistochemical localization of coelomic fluid-specific protein in the coelomic epithelium and mesovarium of chum salmon *Oncorhynchus keta*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 59: 1717-1720.
- 松原孝博, 原彰彦, 高野和則. 1994. サクラマス *Oncorhynchus masou* の体腔液産生に伴う血漿タンパク成分の体腔への移動について. *日本水産学会誌*, 60: 479-483.
- 太田博巳, 楠田聡, 工藤智. 1995. シシャモ精巢精子の運動活性. *日本水産学会誌*, 61:7-12.
- Ohta H., T. Unuma, M. Tsuji, M. Yoshioka and M. Kashiwagi. 2001. 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.*, 32: 385-392.
- 吉澤和俱. 2005. 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. ;83-101.