

## ナマズ精子の希釈液による運動性の比較

藤井亮吏

Comparison of sperm motility among testicular milts diluted with several solutions in Japanese catfish, *Silurus asotus*

RYOJI FUJII

ナマズ (*Silurus asotus*) の養殖において、その採卵手法として、雌雄の親魚を水槽に放養して産卵行動を経て産出された受精卵を得る自然産卵法と、成熟雌から卵を搾出し別に雄から得られた精子を用いて授精操作を行って受精卵を得る人工授精法とが用いられている。岐阜県におけるナマズ種苗生産では、適水温まで加温しやすい小型の水槽で卵を管理できること、浮上仔魚の取り上げが容易になること、採卵時に卵重を計測できるため採卵数の推定が容易であることなどから、主に人工授精による方法を採用している。ナマズの人工授精では、雄親魚から搾出できる精液量が非常に少ないため、搾出した精巢から作製した希釈精液（精巢懸濁液）を用いている（田崎・金澤, 2001）。この時、精子を希釈する希釈液として、リンゲル液（田崎・金澤, 2001）や、淡水魚用生理食塩水あるいは 0.9%食塩水（熊倉, 2005）が用いられてきたほか、ニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) 用人工精漿の使用も試みられてきた（藤井, 2002）。しかし、藤井（2002）がリンゲル液とニジマス用人工精漿で比較したほかは、希釈液の違いによるナマズ精巢精子の運動性の比較はなされてこなかった。そこで、本研究では、ナマズの精子を希釈・培養する希釈液として、リンゲル液、マス類洗卵用等張液、コイ (*Cyprinus carpio*) 用人工精漿、0.9%食塩水、0.6%食塩水を用いて、精子の運動性の比較を行った。

キーワード：ナマズ養殖、精子運動性、人工精漿

### 材料と方法

2014年6月4日に3尾の成熟雄ナマズから搾出した精巢 (M1: 体重 121.80g, 精巢重量 1.01g; M2: 体重 151.55g, 精巢重量 0.84g; M3: 体重 89.88g, 精巢重量: 0.63g) を、

1尾ごとに5つの精巢片にすることで合計15区の試験区を設定した。この試験区に、精巢片の10倍量の希釈液を加え、30秒間ハサミで精巢片を細断することで精巢懸濁液を作り、精子運動性の観察に供した。希釈液には、谷田・島津（編）（1975）が示した Ringer 氏液（以下リンゲル）、本荘・原

第1表 各希釈液の組成

	リンゲル	等張液	人工精漿	0.9%食塩水	0.6%食塩水
NaCl (g)	6.5	9.1	3.6	9.0	6.0
KCl (g)	0.14	0.24	10		
CaCl <sub>2</sub> (g)	0.12	0.256	0.22		
MgCl <sub>2</sub> (g)			0.08		
NaHCO <sub>3</sub> (g)	0.2		0.2		
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g)	0.01				
DW (ml)	1000	1000	1000	1000	1000

(1973) をもとに改変したマス類洗卵用等張液 (以下等張液)、Magyary et al. (1996) のコイ用人工精漿 (以下人工精漿)、0.9%食塩水、0.6%食塩水の 5 種類を用い、それぞれリングル区、等張液区、人工精漿区、0.9%食塩水区、0.6%食塩水区とした。これらの希釈液の組成は第 1 表に示した。精子の運動性は、20  $\mu$  L の精巢懸濁液をスライドガラスに載せ、20  $\mu$  L の飼育水を加え直ちに混合し (接水)、顕微鏡で観察して評価した。精巢懸濁液の作製、観察時の接水操作、検鏡は室温 (25.6-27.6°C) で行った。観察に供するまでの間、作製した精巢懸濁液は 4°C で保存した。

### 観察 1

精巢懸濁液作製 10 分後に、個体ごと、希釈液ごとに精子の運動性を観察した。観察は、接水前および接水直後、接水 0.5 分後、1 分後、1.5 分後、2 分後、2.5 分後、3 分後に行った。精子の運動性の評価は、極めて活発に運動 (++++)、活発に運動 (+++), 一部が停止または緩慢に運動 (++)、大部分が停止 (+)、ほとんどが停止 ( $\pm$ )、完全に停止または振動のみ (-) の 6 段階とした。

### 観察 2

3 個体のうちの 1 個体の雄 (M1) の精巢から作製した精巢

第 2 表 精巢懸濁液作製 10 分後の精子の運動性

接水後時間 (min)	リングル			等張液			人工精漿		
	M1	M2	M3	M1	M2	M3	M1	M2	M3
接水前	$\pm$	$\pm$	$\pm$	-	-	-	-	-	-
0	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
0.5	+++	++	+	++	+++	+++	+++	++	+++
1	++	+	+	++	+	+	++	+	++
1.5	$\pm$	$\pm$	$\pm$	+	$\pm$	$\pm$	+	$\pm$	+
2	-	$\pm$	$\pm$	+	$\pm$	$\pm$	+	$\pm$	+
2.5	-	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
3	-	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	-	$\pm$	$\pm$
接水後時間 (min)	0.9%食塩水			0.6%食塩水					
	M1	M2	M3	M1	M2	M3			
接水前	-	-	-	$\pm$	$\pm$	$\pm$			
0	++++	++++	++++	+++	++	+			
0.5	++	++	++	++	+	+			
1	++	+	+	+	+	$\pm$			
1.5	+	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$			
2	+	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$			
2.5	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$			
3	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$			

++++: 極めて活発に運動; +++: 活発に運動; ++: 一部が停止または緩慢に運動; +: 大部分が停止;  $\pm$ : ほとんどが停止; -: 完全に停止または振動のみ

懸濁液について、懸濁液作製から 1 時間後、1 日後、2 日後、5 日後に希釈液ごとの精子の運動性を観察した。懸濁液作製から 1 日後、2 日後、5 日後の観察では、接水前、接水直後から接水 3 分後までの観察に加え、運動が停止するか、ごくわずかな精子のみが運動する状態となるまで、1 分間隔で観察を続けた。精子の運動性の評価は、観察 1 と同様とした。

## 結果

### 観察 1

接水前の精子は、リングル区および 0.6%食塩水区でごく一部が運動していたものの、人工精漿区、等張液区、0.9%食塩水区では停止または振動のみであった。接水直後の精子は、0.6%食塩水区の M2 で一部が運動を停止した状態、0.6%食塩水区の M3 で大部分が運動を停止した状態であったほかは、活発あるいは極めて活発に運動した。接水 0.5 分後には、極めて活発な精子の動きは見られなくなった。接水 1 分後にはすべてのケースで精子の一部または大部分が運動を停止し、0.6%食塩水区の M3 ではほとんどが運動を停止した状態

となった。接水 1.5-2 分後には、等張液区の M1、人工精漿区の M1 と M3、0.9%食塩水区の M1 で一部の精子が運動していたほかは、ほとんどの精子が運動を停止した状態となった。観察終了の接水 3 分後には、リングル区の M1、人工精漿区の M1 で精子が完全に運動を停止したが、その他の区ではなおごく一部の精子が運動するか、極めて緩慢な運動状態を維持した (第 2 表)。

## 観察 2

精巢懸濁液作製 1 時間後の精子は、すべての試験区で、接水前には停止しており、接水直後に極めて活発に運動した。特にリングル区と 0.6%食塩水区の精子は、精巢懸濁液作成 10 分後のそれらよりも活発に運動した。接水後の運動持続時間については、接水 1 分後にはほとんどの区で運動精子の割合が低下するなど観察 1 と同傾向であった (第 2 表、第 3 表)。

精巢懸濁液作製 1 日後の接水前の精子は、すべての試験区で停止していた。接水直後の精子は、リングル区と 0.6%食塩水区で活発な運動状態、等張液区と 0.9%食塩水区で一部の精子が停止した状態、人工精漿区で大部分の精子が運動を停止している状態となり、人工精漿区、0.9%食塩水区、等張液区では運動性が大きく低下した。精子の運動時間については、人工精漿区、0.9%食塩水区、等張液区、0.6%食塩水区において接水 0.5 分後までに精子の運動割合が低下するなど、ほとんどの区で精巢懸濁液作製 1 時間後の精子に比べて短くなった。ただし、リングル区については、精子の運動割合の低下 (一部の精子の運動停止) が 1 分後であり、精子の運動時間は精巢懸濁液作製 1 時間後の精子と同等であった (第 4 表)。

精巢懸濁液作製 2 日後の接水直後の精子は、リングル区で活発な運動状態、人工精漿区で一部が停止した状態、そ

の他の区で大部分が停止した状態となり、リングル区を除き、運動性が更に低下した。精子の運動時間についても、接水 0.5 分後には、リングル区で一部の精子が停止した状態、その他の区では大部分の精子が停止した状態となり、運動時間が更に短くなった (第 5 表)。なお、等張液区、0.9%食塩水区、0.6%食塩水区の精巢懸濁液において、接水後の運動精子がごくわずかとなった時点で再度 20  $\mu$ L の水で希釈したところ、再び多くの精子が運動を開始し、それらは 0.5 分程度運動を継続した。そこで、さらにもう一度希釈したところ、再度運動する精子が観察された。

精巢懸濁液作製 5 日後の接水直後の精子は、人工精漿区の一部が運動したものの、リングル区と 0.6%食塩水区ではほとんどが停止した状態、等張液区および 0.9%食塩水区では完全に運動を停止した状態となり、ほとんどの区で運動能を失っていた (第 6 表)。以上のように、精巢懸濁液作製後の精子の運動性は、作製 10 分後よりも 1 時間後のほうが高まるものの、それ以降時間経過とともに低下した。また、精子の運動時間についても、ごく一部の精子を除き、時間経過ともなう運動性の低下とともに短くなった。

## 考 察

精子の運動性を維持したまま精液や精巢を希釈して保存するための溶液として、多くの魚種で精漿のイオン組成を模して作成した人工精漿が用いられており、イオン環境や浸透圧など精漿がもたらす諸要因が精子の運動性を制御していることが明らかにされてきた (高橋ほか, 1987; 辻ほか, 2000; 太田ほか, 1995; Bozkurt et al., 2008; Tan-Fermin et al., 1999)。例えば、ニジマス (高橋ほか, 1987)、アユ (*Plecoglossus altivelis altivelis*) (辻ほか, 2000)、シシヤモ

第 3 表 精巢懸濁液作製 1 時間後の精子の運動性

接水後時間 (min)	リングル	等張液	人工精漿	0.9%食塩水	0.6%食塩水
接水前	-	-	-	-	-
0	++++	++++	++++	++++	++++
0.5	+++	+++	+++	+++	++
1	++	++	++	++	+
1.5	+	+	+	+	±
2	+	+	+	+	±
2.5	+	+	+	+	±
3	+	+	+	+	±

++++: 極めて活発に運動; +++: 活発に運動; ++: 一部が停止または緩慢に運動; +: 大部分が停止; ±: ほとんどが停止; -: 完全に停止または振動のみ

(*Spirinchus lanceolatus*) (太田ほか, 1995) では、精漿中の高濃度の K イオンが精子の運動開始を抑制している。一方、ソウギョ (*Ctenopharyngodon idella*) では、精漿中に含まれる高濃度の K イオンが精子の運動性を促進することが知られている (Bozkurt et al., 2008)。コイについても K イオンを高濃度に含む人工精漿が用いられており (黒倉ほか, 1984; Magyary et al., 1996)、人工精漿で希釈した精液中の精子の運動性の向上が報告されている (樋口, 2004; 佐藤, 2005)。このように多くの魚種で精子の運動性を制御する要因として高濃度 K イオンの重要性が報告されているが、その一方でナマズ目魚類であるヒレナマズ属の一種 (*Clarias microcephalus*) では、イオン環境ではなく主に浸透圧が精子の運動開始を制御していることが報告されている (Tan-Fermin et

al., 1999)。本研究では、K イオンの多い人工精漿、K イオン濃度を特に増加させていないリンゲルや等張液、K イオンなどを含まない濃度の異なる食塩水の計 5 種類を用いてナマズの精巢懸濁液を作成し、懸濁液作成 10 分後および 1 時間後の各懸濁液の精子運動性を比較した。その結果、0.6% 食塩水で作製した精巢懸濁液の作製 10 分後を除き、いずれの希釈液を用いた場合においても精巢懸濁液中の精子は良好な運動性を示し (第 2 表、第 3 表)、精子の運動時間についても、0.6 あるいは 0.9% の単純な食塩水で作製した精巢懸濁液と、複数の塩類が混合されたリンゲル、等張液、人工精漿で作製した精巢懸濁液との間に、塩類組成の重要性を表す明確な差異は認められなかった (第 2 表、第 3 表)。このことは、Tan-Fermin et al. (1999) の報告と同様、ナマズの精

第 4 表 精巢懸濁液作製 1 日後の精子の運動性

接水後時間 (min)	リンゲル	等張液	人工精漿	0.9%食塩水	0.6%食塩水
接水前	-	-	-	-	-
0	+++	++	+	++	+++
0.5	+++	+	+	++	++
1	++	±	+	+	+
1.5	+	±	±	+	+
2	±	±	±	+	+
2.5	±	±	±	±	+
3	±	±	±	±	+
4	±	±	±	±	+
5	±	±	±	±	+
6	±	±	±	±	+
7	±	±	±	±	+
8	±	±	±	±	±
9	±	±	±	±	±
10	-	±	-	-	±
11		±			±
12		±			±
13		±			±
14		±			±
15		-			±
16					±
17					±
•					•
23					±
24					-

++++: 極めて活発に運動; +++: 活発に運動; ++: 一部が停止または緩慢に運動; +: 大部分が停止; ±: ほとんどが停止; -: 完全に停止または振動のみ

子運動性が主に浸透圧によって制御されている可能性を示すものであり、ナマズの人工授精作業において精子の運動性を制御する場合に、高濃度のKイオンをはじめとする種々のイオン環境は必ずしも求められないことを示唆している。しかし、本研究は既存の5種類の希釈液で精巢懸濁液を作製してその精子の運動性を比較したものであり、精漿を構成する各種イオンや浸透圧が精子運動性に与える影響を個別に評価したものではないため、結論を得るには、今後、各要因が精子の運動性に与える影響を実験的に検証する必要がある。

精巢懸濁液作製後の時間経過に伴う接水直後の精子運動性の変化について整理すると、精子の運動性は、精巢懸濁液作製1時間後が最も良好であり、1日後および2日後に

は極めて良好な精子の運動が確認できなくなり、さらに5日後には等張液区や0.9%食塩水区で全く運動を確認できなくなるなど著しく低下した(第2表-第5表)。このような精巢懸濁液作製後の時間経過に伴う精子の運動性の低下は、いずれの希釈液を用いた場合にも確認され、長時間にわたり精子の運動性を保持できる希釈液を見出すことはできなかった。この結果は、精子の運動性を長時間保持できるという評価視点においても、ナマズでは精漿を構成する種々のイオン環境が浸透圧に比べてそれほど重要ではないことを示唆している。ただし本研究では、精巢懸濁液の無菌的な実験操作が行われておらず、細菌の繁殖を抑制するための抗生物質の添加も行われていないことから、細菌の繁殖によって精子の運動性が一律に低下した可能性を否定できないため、結

第5表 精巢懸濁液作製2日後の精子の運動性

接水後時間 (min)	リンゲル	等張液	人工精漿	0.9%食塩水	0.6%食塩水
接水前	-	-	-	-	-
0	+++	+	++	+	+
0.5	++	+	+	+	+
1	+	±	+	±	±
1.5	+	±	±	±	±
2	+	±	±	±	±
2.5	±	±	±	±	±
3	±	±	±		±
4	±	±	±		±
5	±	±	±		±
6	±		±		±
7	±		±		±
8	±		±		±
9	±		±		
10	±		±		
11	±				
12	±				
13	±				
14	±				
15	±				
16	±				
17	±				
18	±				
19	±				
20	±				

++++: 極めて活発に運動; +++: 活発に運動; ++: 一部が停止または緩慢に運動; +: 大部分が停止; ±: ほとんどが停止; -: 完全に停止または振動のみ

論を得るには細菌の繁殖などの二次的要因を排除できる試験設計で再検討する必要がある。なお、実際のナマズの人工授精作業では、採卵当日に精巢懸濁液を作製することが多く、希釈した精巢懸濁液を翌日以降に使用することは極めて希である。ナマズ養殖に関する成書（田崎・金澤，2001）においても、希釈精液の保存可能時間は常温で 2-3 時間とされており、長期の保存は想定していない。したがって実際の授精作業においては、本研究で見られた精巢懸濁液作製翌日以降の精子の運動性の低下は大きな問題にならないと考えられる。

以上のように、ナマズの人工授精において精巢懸濁液を作製する場合、特に精漿や体液のイオン組成を模した溶液を希釈液に用いなくても、等張性の保たれた食塩水を用いることで精子の運動性を実用上問題のないレベルで十分保持できることが示された。ナマズ生産者が種々の塩類を正確に秤量し人工精漿を作製することは必ずしも容易ではないため、種苗生産技術の普及時の障壁ともなっているが、本研究により単純な組成の食塩溶液でも実用上問題がないことが示されたことにより、生産現場における精巢懸濁液作製時の希釈液準備作業が簡素化できると考えられる。また、精子の運動性は、精巢懸濁液作製 1 時間後のほうが作製 10 分後よりも良好であったことより、人工授精作業を行う場合には、精子の運動性の向上に必要な時間を見越して、卵の搾出作業

の前に精巢懸濁液の作製作業を行うと効率的であると考えられる。

本研究においてリングルおよび 0.6%食塩水で精巢懸濁液を作製した場合に、接水前の精子が運動していることを観察した。接水前の精子の運動は、ニシキゴイ精液をリングル液、食塩水、人工精漿で希釈した場合（佐藤，2005）や、アユ精液を精漿および人工精漿で希釈した場合（辻ほか，2000）においても観察されている。加えて本研究では、精子が運動を停止した接水後の精液に再び水を加えると再度精子が運動することを観察した。辻ほか（2000）はこの原因として、個々の精子ごとに精漿中の運動抑制作用に対する反応性が異なるためであると推測している。ナマズの場合でも、精子ごとに運動を開始する浸透圧が異なるために、希釈のたびに別の精子が運動を開始している可能性が考えられる。しかし、本研究では、各希釈時の精子の運動割合や個々の精子に着目した観察などの、原因を明らかにするために必要なデータを収集していないため、原因は不明である。どのような原因であったとしても、効率的な受精を誘導するためには、接水時に出来る限り多くの精子を高密度で運動させる必要があることから、今後は接水時の希釈比率を変えて精子の運動性を観察し、接水時の最適希釈比率を明らかにする必要がある。

第 6 表 精巢懸濁液作製 5 日後の精子の運動性

接水後時間 (min)	リングル	等張液	人工精漿	0.9%食塩水	0.6%食塩水
接水前	-	-	-	-	-
0	±	-	+	-	±
0.5	±		+		±
1	-		+		-
1.5			±		
2			±		
2.5			±		
3			±		
4			±		
5			±		
6			±		
7			±		
8			-		

++++: 極めて活発に運動; +++: 活発に運動; ++: 一部が停止または緩慢に運動; +: 大部分が停止; ±: ほとんどが停止; -: 完全に停止または振動のみ

## 要 約

1. ナマズの精子を希釈・培養する希釈液として、リンゲル液、マス類洗卵用等張液、コイ用人工精漿、0.9%食塩水、0.6%食塩水を用い、希釈液の違いによる精子の運動性の比較を行った。
2. 5種類の希釈液を用いて精巢懸濁液を作製し運動性を比較したところ、精巢懸濁液作製10分後の段階では、0.6%食塩水で精子の運動性が劣っていたものの、その他では受精に影響するような大きな差はなく、精巢懸濁液作製1時間後では、すべてで接水直後の運動性は極めて良好であり、0.5分後においても精子の運動はおおむね良好であった。
3. 精巢懸濁液作製後の時間経過による精子運動性の低下については、作製後1時間が最も運動性が良好であり、1日後や2日後には接水直後であっても極めて良好な精子の運動は見ることができず、5日後には運動性が著しく低下していた。
4. 観察された精巢懸濁液作製翌日以降の精子の運動性の低下は、実際の授精作業では採卵当日に精巢懸濁液を作製することが多く、大きな問題にならないと考えられた。
5. 精巢懸濁液作製1時間後のほうが作製10分後よりも良好であったことから、人工授精作業を行う場合には、精子の運動性の向上に必要な時間を見越して卵の搾出作業の前に精巢懸濁液の作製作業を行うと効率的であると考えられた。
6. ナマズの人工授精において精巢懸濁液を作製する場合、希釈液として単純な組成の食塩溶液を用いても実用上問題がなく、生産現場における精巢懸濁液作製時の希釈液準備作業が簡素化できると考えられた。

## 文 献

Bozkurt, Y., F. Ögretmen, U. Erçin and Ü. Yıldız. 2008. Seminal plasma composition and its relationship with

physical spermatological parameters of Grass carp motility. *Aquaculture Research*, 39: 1666-1672.

藤井亮史. 2002. ナマズの養殖量産化研究. 平成12年度岐阜県淡水魚研究所業務報告: 16.

樋口正仁. 2004. コイ用人工精漿を用いたニシキゴイ精液の希釈・保存. *みなも*, 38: 1.

本荘鉄夫・原 武史. 1973. ヤマメ・アマゴ. 養魚講座, 第8巻. 緑書房, 千代田区. 184pp.

熊倉直樹. 2005. 20-B ニホンナマズ (Japanese) catfish. 隆島史夫・村井 衛 (編), pp. 232-237. 淡水魚, 水産増養殖システム2. 恒星社厚生閣, 新宿.

黒倉 寿・富田政勝・岩橋正雄・宮尾 誠・岩田仲弘・平野礼次郎. 1984. ニシキゴイ精液の長期保存. *水産増殖*, 32: 148-151.

Magyary, I., B. Urbányi and L. Horváth. 1996. Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm II. Optimal conditions for fertilization. *J. Appl. Ichthyol.*, 12: 117-119.

太田博巳・楠田 聡・工藤 智. 1995. シシヤモ精巢精子の運動活性. *日本水産学会誌*, 61: 7-12.

佐藤 将. 2005. ニシキゴイ精液の希釈・保存. 新潟県内水面水産試験場調査研究報告, 29: 30.

高橋一孝・猪田利夫・森沢正昭. 1987. ニジマス精子の簡便な保存法. *養殖*, 24: 101-105.

Tan-Fermin, J. D., T. Miura, S. Adachi and K. Yamauchi. 1999. Seminal plasma composition, sperm motility, and milt dilution in the Asian catfish *Clarias microcephalus* (Gunther). *Aquaculture*, 171: 323-338.

谷田専治・島津忠秀 (編). 1975. 水産増養殖用語辞典. 緑書房, 千代田区. 103pp.

田崎志郎・金澤 光. 2001. ナマズの養殖技術. 野村 稔監修, 新魚叢書6. (社)新魚種開発協会, 渋谷区. 55pp.

辻 将治・池田和夫・太田博巳. 2000. アユ精子の運動開始を導くイオン環境の変化. *日本水産学会誌*, 66: 55-61.