

マガキ精液の長期凍結保存

薄 浩則・浜口 昌巳・石岡 宏子

Long-term Cryopreservation of Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*, Sperm

Hironori Usuki, Masami Hamaguchi and Hiroko Ishioka

Three diluents containing cryoprotectants and three cooling methods were tested in combination to determine an effective method for the cryopreservation of Pacific oyster *Crassostrea gigas* sperm. The combination of a diluent containing 8%(v/v) dimethyl sulfoxide (DMSO), 50mM sucrose and 6mM reduced glutathione with cooling in liquid nitrogen vapor showed the highest relative larval yield (45.9%). The viability of sperm was highest (74.4%) when the rate of temperature increase by the heat of solidification was the lowest among three cooling conditions in liquid nitrogen vapor. Fertility with sperm cryopreserved at a concentration of 10^8 spermatozoa / $200 \mu\text{l}$ was equivalent to that with fresh sperm when ova were inseminated in a concentration of 10^3 spermatozoa per ovum.

Although spermatozoa cryopreserved for 4 years showed lower viability (40.3~53.3%) than the short-term cryopreserved spermatozoa (60~70%), the ratio of normal D-shaped larvae and survival rate at 6 days after fertilization were 78.0 and 77.4%, respectively. The mean shell length of the larvae at 6 days after fertilization was marginally larger in the larvae from preserved sperm inseminated eggs ($99.9 \pm 6.7 \mu\text{m}$) than that from fresh sperm inseminated eggs ($95.2 \pm 7.7 \mu\text{m}$), probably this is because of the low rearing density.

Key words: *Crassostrea gigas*, oyster, spermatozoa, cryopreservation

配偶子の凍結保存は系統保存、飼育管理の省力化および各種生物検定など様々な分野での応用が期待でき、家畜類の精子ではすでに実用化されている。水産動物の配偶子についても凍結保存技術の実験的な研究はなされているが、育種の気運が希薄であったことから実用化には至っていない。しかし近年、生物多様性の保全への関心が高まるなか、水圏生態系構成種の遺伝資源保存技術の一つとしても配偶子の凍結保存に関して実用化への進展が求められている。

一般的に精子は卵に較べ取り扱いや実験設定が容易であり、水産無脊椎動物においてはウニ、アワビやカキなどの精液の凍結保存に関する報告がある。マガキ *Crassostrea gigas* (Thunberg) については性転換する性質を利用し

て凍結精液による自家受精も試みられている (Lannan 1971)。

マガキ精液の凍結保存に関するこれまでの研究により、凍害保護剤としてはジメチルスルホキシド (DMSO) が有効であること (Bougrier and Rabenomanana 1986, 岩田他 1989, Yankson and Moyse 1991)、凍結精液の受精能力が新鮮精液より劣ること (岩田他 1989) が明らかにされている。冷却方法としてはメタノール・ドライアイスを用いた方法 (岩田他 1989) や液体窒素蒸気を用いた方法 (Lannan 1971, Bougrier and Rabenomanana 1986) などが採用されているが、液体窒素蒸気中での比較的急速な冷却に関しては適切な冷却条件が十分に検討されておらず、具体的な冷却条件が冷却速度や凍結精子の性状

に与える影響を検討する必要がある。また、生物検定など同じ個体から採取した精液を多回にわたり使用する必要がある場合、多くのロットに分けて保存することが要求されるため、原精液の希釈が解凍後の精子に及ぼす影響や媒精に必要な精子数の評価が必要となる。さらに、これまでの研究例での保存期間は数日～数ヶ月であるが、実用的には数年間に亘る保存が要求されるため、長期保存が精子に及ぼす影響を評価する必要もある。

本研究では産業的にも重要であるマガキの精液の凍結保存について過去の研究例を基礎として、補助的な凍害保護剤の添加効果、液体窒素蒸気による方法を中心とした冷却条件、冷却時の精子濃度が媒精後の発生に及ぼす影響および受精に必要な卵あたりの精子数を検討するとともに、その結果に基づいて冷却後長期間保存した精液で媒精した卵の発生経過から、凍結精液の実用化の可能性を探ることを目的とした。

材料および方法

全体に共通する方法

実験は1991年8月から1995年9月にかけて行った。材料には、南西海区水産研究所（広島庁舎）地先の筏に垂下したカゴ内で養成した1～3歳の広島産または宮城産マガキを用い、殻表面に付着した生物や泥などを取り除いて殻を開け、ガラスピペットで外套膜を貫通して採精・採卵を行った。

凍害保護剤の溶媒は岩田他（1989）に基づき2/3濃度人工海水とした。原精液を2/3濃度人工海水により一定の濃度に希釈し、これとは別に凍害保護剤を添加した希釈液を作成後これらを1:4の比率で混合して保存用の精液とし、容量500 μ lの牛精子用ストロー精液管（外径3mm、長さ125mm、塩化ビニール製、富士平工業(株)）に200 μ lを充填後、一端を熱融解して封入した。保存用精液の精子濃度は10⁸精子/200 μ lを基本とした。封入後すぐに冷却を開始し、冷却終了後のストロー管は液体窒素中で少なくとも1時間以上保存した。温度変化は密封していないストロー管中の精液に熱電対センサーを直

接差し込んで記録した。

解凍は攪はんした室温水道水中にストロー管を1分以上浸漬することにより行った。精子の生残率は0.3%トリパンブルー溶液を用いたdye exclusion法により判定し、顕微鏡下での運動性は++（殆どの精子が活発に運動）、+（ほぼ半数以上の精子が運動）、±（ほぼ半数以上の精子が静止）、-（ほぼすべての精子が静止）の4段階で評価した。

媒精は27°Cに設定したウォーターバスにセットしたフラスコ（容量100ml）内の100ml海水中へ10⁸個の卵を入れた直後にストロー管1本分の精液を添加しフラスコを手で軽く振って攪はんすることにより行い、精液添加後の洗卵は行わなかった。媒精には顕微鏡下で外見的に十分な熟度と思われる卵を使用した。媒精2～3時間後にフラスコ底から採取した卵に占める分割卵の割合をここでは受精率とし、また、媒精6～7時間後、攪はん棒でフラスコ内を攪はんした直後に採取した一定量の海水中の浮遊幼生と卵を計数して浮遊幼生率を算出した。

幼生の飼育は孔径0.2 μ mのカートリッジフィルターで濾過した海水を入れたガラス製の3l容ビーカー中で行い、餌料としてはハプト藻類 *Pavlova* sp. を用いた。

凍害保護剤と冷却方法の検討 凍害保護剤の種類と冷却方法を組み合わせて精液を凍結し、液体窒素中に20時間保存後解凍して精子の生残率を算出した。また、新鮮精液を用いた場合の浮遊幼生率に対する凍結精液を用いた場合の比率を相対浮遊幼生率とした。冷却時には各組み合わせとも4本のストロー管を供試した。

凍害保護剤 ここでは8% DMSOを主たる凍害保護剤とするなかで、脱水の促進と細胞膜の保護および水分子の安定の観点から、補助的な保護剤としてシュクロースと還元型グルタチオンおよび牛胎児血清を添加した下記の希釈液について、解凍後の精子生残率と浮遊幼生率を比較した。凍害保護剤の濃度はいずれも精液と混合後の最終濃度（%は体積比）を示す。

希釈液 A：8% DMSO

希釈液 B：8% DMSO, 50 mM シュクロース, 6 mM 還元型グルタチオン

希釈液 C : 8% DMSO, 36 mM シュクロース, 4.3 mM 還元型グルタチオン,
20% 牛胎児血清

なお、以下の実験では希釈液 B を用いた。

冷却方法 プログラムフリーザー等の特殊な機器を使用せずにストロー管を冷却する方法として、

方法 1 : 液体窒素保存容器中の液面から 5 cm 上方の窒素蒸気中に底面を固定した金属製キャニスター中に垂直に収容, 10 分間静置

方法 2 : 岩田他 (1989) の冷却方法に基づき, ガラス製試験管に収容してメタノール・ドライアイス中に 60 分間浸漬

方法 3 : ストロー管のまま超低温庫内 (-80°C) に 60 分間静置

の 3 法を比較した。

液体窒素蒸気中での冷却方法の検討

液体窒素保存容器内の蒸気中で, 下記の条件により冷却後保存した。ここでは解凍後の精子生残率のみを比較した。

条件 I : ビニール製チューブ (内径 4 mm, 長さ約 30 mm) を束ねて作成した支持台にストロー管どうしが接触しないように差し, 下端が液体窒素表面から 5 cm の距離になるように垂直に固定。

条件 II : 同じく 10 cm の距離になるように固定。

条件 III : ストロー管を合成樹脂製の収納管 (内径 9 mm, 長さ約 120 mm) に入れて同じく 5 cm の高さになるように垂直に固定

なお, 長期保存用の精液を除いた以下の実験においては条件 I により冷却した。

冷却時の精子濃度の検討

原精液 (濃度 2.5×10^{10} 精子/ml) を 10^6 , 10^7 , 10^8 精子/200 μ l の濃度に希釈して凍結保存した精子について, 生残率とそれぞれの濃度で媒精したときの受精率を新鮮精子と比較した。

卵あたり必要な精子数の検討

新鮮および凍結精液の媒精時の精液量を調節

することにより 10~1,000 精子/卵の割合で媒精し, 受精率と浮遊幼生率を比較した。

長期保存精液による媒精と幼生飼育

上記希釈液 B, 冷却条件 III により 1991 年 8 月に保存した精液を約 4 年後の 1995 年 9 月に解凍し, 精子の生残率と媒精後の受精率, 正常 D 型率, 媒精 6 日後の生残率と殻長を新鮮精液と比較した。

結 果

凍害保護剤と冷却方法の検討 結果を Table 1 に示す。解凍後精子の生残率はどの冷却方法でも希釈液 C を用いた場合が 70% 以上で最も高い値を示した。一方, 相対浮遊幼生率はどの希釈液においても方法 1 で最も高かった。方法 1 の希釈液間で浮遊幼生率を比較すると希釈液 B が 45.9% で最も高く, 精子生残率が高かった C は 12.4% と最も低い値であった。また, 希釈液 B では解凍後の精液の凝集の程度が A より軽微で媒精時の取り扱いが容易であった。

なお, -60°C までの平均冷却速度は方法 1 で -114.3°C/min, 2 で -9.4°C/min, 3 で -6.1°C/min であった。

液体窒素蒸気中での冷却方法の検討 -100°C までの冷却曲線を Fig. 1. に, 精子の生残率を Table 2. に示す。条件 I と II では計測開始後 10~25 秒の間に過冷却後の凝固潜熱の放出による顕著な温度上昇がみられるが, 条件 III では凝固潜熱の放出がこれらより高温で開始されており, 冷却中の温度上昇がほとんど見られない。各条件内の生残率のばらつきは比較的小さく, この範囲では最も冷却速度が遅い条件 III が 74.4% と他の二法よりもあきらかに高い生残率を示した。

冷却時の精子濃度の検討 結果を Table 3 に示す。 10^8 区の精子生残率の平均値は新鮮精液で 98.2% であったが凍結精液では 73.2% であり, この値は冷却時の精子濃度が低くなるにつれてさらに低下した。受精率の平均値は 10^8 区で新鮮精液の 36.2% に対し凍結精液では 28.0% であったが, 10^7 区では新鮮精液 30.3% に対し凍結精液では 1.5% と急激に低下した。また, 新鮮精

Table 1. Effect of diluent type and cooling method on the viability and motility of cryopreserved spermatozoa and relative larval yield

Diluent	Cooling method	Viability of sperm (%)	Motility	Relative larval yield (%)
A	1	61.4	±	34.4
	2	65.4	±	3.8
	3	55.3	±	1.9
B	1	72.7	±	45.9
	2	57.7	±	6.7
	3	52.2	±	1.9
C	1	77.5	+	12.4
	2	72.5	+	1.0
	3	75.5	±	0

Diluent

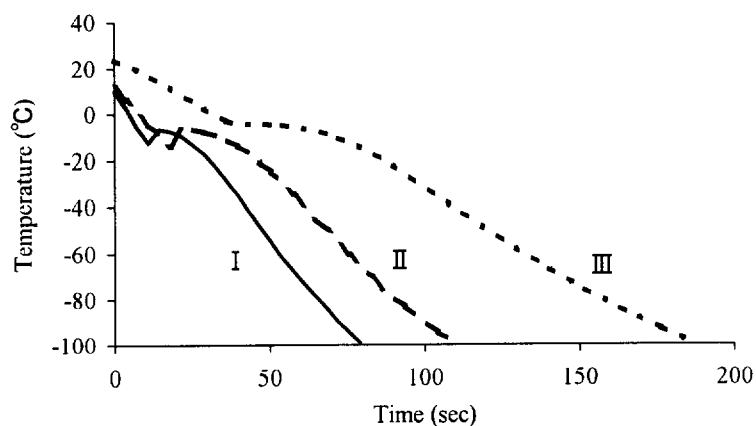
A: 8% DMSO

B: 8% DMSO, 50 mM sucrose, 6 mM reduced glutathione

C: 8% DMSO, 36 mM sucrose, 4.3 mM reduced glutathione, 20% fetal bovine serum

Cooling method

1: nitrogen vapor, 2: methanol-dry ice, 3: deep freezer (-80°C)

**Fig. 1.** Temperature changes of sperm in the straws cooled in liquid nitrogen vapor.I: exposed, 5 cm above LN₂; II: exposed, 10 cm above LN₂; III: in sheath, 5 cm above LN₂**Table 2.** Viability and cooling rate of sperm cooled in nitrogen vapor

Cooling condition	Viability of sperm (%)			Average cooling rate until -60°C (°C/min)
	mean	s.d.	n	
I	63.4	5.0	5	-79.8
II	59.9	7.1	5	-57.5
III	74.4	5.9	5	-38.2

Table 3. Effect of sperm concentration at cryopreservation on the viability and fertility

Concentration (spermatozoa per 200 μ l)	Fresh sperm (%)				Cryopreserved sperm (%)			
	Viability		Fertility		Viability		Fertility	
	mean	s.d.	mean	s.d.	mean	s.d.	mean	s.d.
10 ⁸	98.2	3.5	36.2	3.3	73.2	8.8	28.0	2.0
10 ⁷	-	-	30.3	1.9	45.2	15.8	1.5	0.3
10 ⁶	-	-	4.3	1.8	18.4	8.0	0.2	0.2

Each experiment consisted 3 replicates except for the 10⁸ cryopreserved sperm for which 4 replicates were carried out.

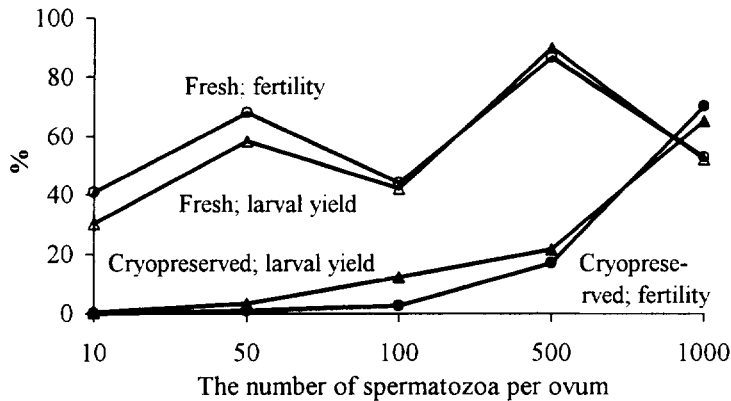


Fig. 2. Effect of the number of spermatozoa per ovum on fertility and rate of larval yield.

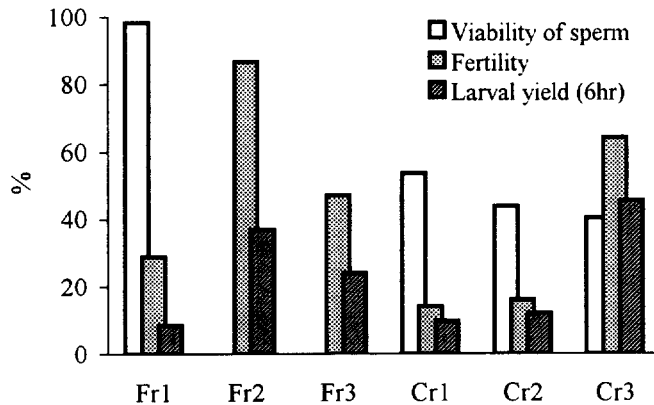


Fig. 3. Viability of sperm, fertility and rate of larval yield obtained with fresh and long-term cryopreserved sperm. Fr1-3; 3 replicates of fresh sperm. Cr1-3; 3 replicates cryopreserved sperm.

液でも 10⁶ 区においては受精率が 4.3% まで低下した。

卵あたり必要な精子数の検討 結果を Fig. 2. に示す。新鮮精液を用いた媒精では全体としては卵あたりの精子数の減少に伴い受精率がやや低下する傾向があるものの、10 精子/卵でも 41%

の受精率を示した。一方、凍結精液の場合は 100 精子/卵でも 2% 以下であり、1,000 精子/卵で初めて新鮮精液並みの受精率に達した。浮遊幼生率は受精率によく対応していた。

長期保存精液による媒精と幼生飼育 精子生残率、受精率と浮遊幼生率を Fig. 3. に、正常 D 型

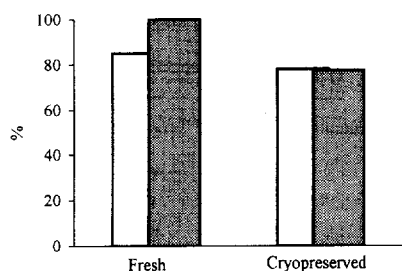


Fig. 4. Early larval development rate obtained with fresh and long-term cryopreserved sperm. Open: Normal D-shaped larvae. Solid: Survival rate at 6 days

Table 4. Shell length of larvae 6 days after fertilization obtained with fresh and long-term cryopreserved sperm

	Mean (μm)	S.D. (μm)	n
Fresh	95.2	7.7	86
Cryopreserved	99.9	6.7	138

幼生率と飼育 6 日後の生残率を Fig. 4. に示す。精子の生残率は新鮮精液で 98.2% であったのに対し、凍結精液では 40.3~53.5% であった。受精率は同じ実験区でもストロー間でばらついたが、平均値で比較すると新鮮精液の 54.2% に対し、凍結精液では 31.4% であり、相対受精率は 57.9% であった。浮遊幼生率の平均値は新鮮精液で 23.2%、凍結精液で 22.5% であった。

凍結精液を用いた場合、正常 D 型率、6 日後生残率とも新鮮精液を用いた場合よりやや低かったものの 77% 以上であった。一方、6 日後幼生の殻長の平均値は新鮮精液区で 95.2 μm 、凍結精液区で 99.9 μm であり (Table 4.)、t 検定により両者間に危険率 1% で有意差が認められた。

考 察

マガキ精液凍結用の希釈液として岩田他 (1989) は 5/6 濃度人工海水に含んだ範囲 4~16% の DMSO6 段階を比較し、8% で最も高い受精率を得ている。また、Yankson and Moyse (1991) は

0.6% のグリシンを添加した紫外線照射濾過海水に 5~20% の DMSO を溶解した希釈液を比較し、マガキの受精率においては 10% で、浮遊幼生率においては 20% で最高であったとし、さらにマガキと同属である *C. tulipa* の精液では、0.6% グリシンの補助的添加は無添加に較べ精子の生残率が向上することを確認している。

本研究ではこれらの報告に基づいて DMSO の濃度を 8% としたが、補助的な凍害保護剤の組成が異なる希釈液で解凍後の精液の特性に差がみられた。牛胎児血清は哺乳類の培養細胞や微生物の凍結保存において使用されており、細胞周辺における水分子の安定化に役立つと考えられている (僧都 1989)。本研究において牛胎児血清を含む希釈液 C では生残率・運動性ともにそれを含まない A, B より高い傾向を示したが、これらは相対浮遊幼生率には反映されなかった。このことより、希釈液 C で用いた牛胎児血清は解凍精子の受精能力を何らかのかたちで低下させるか、あるいは正常な胚発生を阻害する可能性があると思われた。

シュークロースなどある種の糖類や糖アルコール類は非透過性凍害保護剤として細胞の脱水に関与した保護作用を示す言われている (Franks 1985)。また、還元型グルタチオンは赤血球や水晶体 (種不明) などの細胞膜の維持作用があると言われている (坂本 1989) のに加え、大西洋サケ *Salmo salar* (Mounib 1978) およびウシ (Lindemann *et al.* 1988) で保存精子の運動性の保持効果が認められている。本研究でシュークロースと還元型グルタチオンを添加した希釈液 B において、解凍後の精子の生残率や運動性が特に高い傾向は認められなかった。しかし、無添加の A に比べ高い相対浮遊幼生率を示したことと解凍精液の凝集が A より軽減される傾向が観察されたことから、以後のマガキ精液凍結保存用の希釈液としては希釈液 B を用いた。

一般的に微生物、動物の配偶子や培養細胞を凍結保存する際の冷却法としては、ペレット法、メタノール・ドライアイス法、液体窒素蒸気法、ガラス化法やプログラムフリーザーを用いる方法などがある。これまでのカキ類精液の

凍結保存例において、冷却速度や予備凍結温度も含めた冷却方法は様々で、詳細が不明のものもある。本研究においては冷却方法の違いは希釈液の違いよりも相対幼生浮遊率に大きな影響を与え、冷却方法の重要性が確認された。

岩田他（1989）は、8% DMSO を凍害保護剤としメタノール・ドライアイスを用いた冷却法により約 100% の相対受精率を得ているが、本研究においてメタノール・ドライアイスによる冷却法（方法 2）では好結果が得られなかった。岩田らが示す冷却曲線から読みとれる冷却開始 10 分後の温度は約 -25°C であるが、本研究の冷却方法 2 においては -67.5°C で、方法 3 においても -36.5°C であり、急速に冷却されたため -80°C 付近における保持時間が 30 分以上に達しこの間に精子に何らかの低温障害等が蓄積した可能性も考えられる。

もし、本研究と岩田らとの結果の差が用いた器材の仕様やストロー本数等の差に起因する冷却速度の違いのみによるものであるなら、同じメタノール・ドライアイス法といえども、実際の冷却操作にあたり冷却曲線の確認は欠かせないといえる。

液体窒素保存容器内で冷却を行う液体窒素蒸気法は、冷却した試料を液体窒素中で保存する事を前提とする限り、特別な器機や資材の入手を必要とせず最も容易に実行でき、時間当たり処理できる試料数も多いという利点がある。Bougrier and Rabenomanana (1986) は 10% DMSO を凍害保護剤として用い、液体窒素液面の 5 cm 上方の蒸気中で 3 分間冷却後液体窒素中へ保存することにより 46.9~92.4% の相対受精率を得ているが、冷却速度等の詳細は不明である。本研究では、液体窒素蒸気中におけるいくつかの冷却条件により冷却速度の違いによる解凍後の精子生残率の差を指摘した。条件 III と他の 2 条件の間でみられる凝固潜熱の放出過程の違いから、この 2 者間では凍結時における精子細胞内外での氷晶形成状況が異なっていると推察されるが、生残率の平均値の差は 14% 以下で、少なくとも生残率においてはここでの条件の違いが凍結保存の可否に決定的に作用しているとは言えないと考えられた。また、条件 III に

より同一の収納管に複数本のストロー管を収納して冷却する場合、ストロー管と収納管、あるいはストロー管どうしの微妙な接触具合の差によって冷却曲線の再現性が損なわれ易いことが予備実験で認められ、個々のストロー管を均一条件で冷却する必要がある実験条件としては不適であると考えられた。さらに、液体窒素表面からの距離は小さい方が外気の影響を受けにくいと考えられ、以後の実験における冷却は条件 I により行った。

マガキ精液の冷却時の精子濃度について Bougrier and Rabenomanana (1986) は本研究とは異なる種類の希釈液を用いて、1/5~1/20 の希釈率のうち 1/15 が有意に受精率が高かったと述べている。本研究では、採精時における海水の混入の可能性や媒精に必要な精子数を求める必要性を考慮し、希釈の指標は原精液の希釈率ではなく精子濃度（ストロー管あたりの精子数）とした。予備実験からは新鮮精液の生残率が希釈により低下することは観察されなかったが、凍結精液においては冷却時の精子数の減少に伴い明らかな生残率の低下がみられた。

受精率の評価は容器内の卵密度や卵あたりの精子数などの条件により異なると考えられるが、本研究の条件下では凍結時の精液濃度で 10^8 精子/200 μl から 10^7 精子/200 μl にかけて、生残率は 2 分の 1 も低下していないが、受精率は 18 分の 1 程度まで急激に低下した。Kurokura et al. (1990) は凍結前後のマガキ精子の生残率および形態の変化からだけでは極端な受精能力の低下を説明しえないとしており、本研究における結果もこれを裏付けるものであった。

これら、本条件下における生残率と受精率から、冷却時の精子濃度は最低でも 10^8 精子/200 μl は必要であり、本研究全般における採取直後の原精液の濃度が最高でも 6×10^8 精子/200 μl であったことから、生物検定への利用など多数のロットが必要とされる場合でも冷却時の希釈倍率は十倍から数十倍が限界であると考えられた。希釈可能限界としてとらえた場合、Bougrier and Rabenomanana の結果と本研究の結果は、希釈液の組成の差に関わらず近いものとなった。

1 個の卵あたりの凍結精子数について、岩田

他(1989)は30 ml中に卵を 10^4 個という条件で $10^4 \sim 10^5$ 精子/卵で新鮮精液にほぼ匹敵する受精率が得られたとしている。本研究では500精子/卵以下の場合の受精率は新鮮精液に及ばず、1000精子/卵において初めて新鮮精液並みの受精率を示した。媒精時の海水中の精子濃度により結果は異なると思われるが、本条件下では1個の卵の受精には冷却時の数で最低 10^3 の精子が必要であると考えられた。また、分裂速度は測定していないものの、浮遊幼生率が受精率によく対応していることから、新鮮精液の代わりに凍結精液を使用することにより卵の分割の進行が大きく阻害されることは無いと推察された。

ウマの凍結精液は半永久的に保存できると考えられ、15年貯蔵したのもでも運動性は凍結直後のものと変わらない(四之宮1989)。本研究では、短期間保存した凍結精子の生残率がTable 1., 2. および 3. など数例で60~70%程度であったのに対し、長期保存精液ではこれらより低い傾向を示し、液体窒素温度においても長期間の保存中に精子の劣化が進行したと推察され、受精率も新鮮区の6割以下であった。一方、媒精33時間後の浮遊幼生は新鮮精液区、凍結精液区ともに殆どがD型化しており、この時点での正常D型幼生率と6日後の幼生の生残率は各々78.0%, 77.4%であり、新鮮精液を用いた場合より下回りはしたものの実用に耐えうる値であった。媒精6日後における凍結区幼生の殻長の平均値は、新鮮区のものより有意に大きなものとなった。媒精後2日目の幼生の飼育密度は凍結区は8.8個/mlに対し新鮮区の10.3個/mlであり、この時点で両区とも5個/mlに調整したがその後の生残も新鮮区の方が高めであった。このような飼育密度の違いから殻長の差が生じたことが考えられるが、少なくとも凍結区の幼生が新鮮区より成長が劣るということはなかった。これらのことから、媒精後の発生進行に寄与した解凍精子のうち多くのものはその後の初期発生に大きな支障を来すほどの損傷は受けていなかったと考えられ、長期保存精液から得た幼生の実用性が確認された。

以上、本研究ではDMSOの他に補助的な凍害

保護剤を用いて液体窒素蒸気中で冷却することで最も高い幼生浮遊率が得られた。また、液体窒素蒸気による冷却のなかでも凝固潜熱の放出による温度上昇が緩やかな冷却条件で精子生残率が高いことを示した。さらに、これらの条件で冷却後液体窒素中に4年間保存したマガキ精液が媒精に使用でき、幼生の初期発生においても重大な異常は無く実用的な使用が可能であることを明らかにした。しかし、長期保存に伴い精子生残率の低下がみられたことから、媒精に使用する卵あたりの精子数は短期保存精子の場合より多めにする必要があることが示唆された。今後は、多数のロットを一度に且つ均一条件で冷却でき、長期間保存においても精子が劣化しない希釈液や冷却方法の工夫が必要であろう。

摘 要

マガキ精液の凍結保存において、8% DMSOを主要な凍害保護剤とする3種の希釈液と3種類の冷却方法をそれぞれ組み合わせて比較した結果、8% DMSO, 50 mM シュークローズ及び6 mM 還元型グルタチオンを凍害保護剤とする希釈液を用い、液体窒素蒸気中で冷却する方法で最も高い浮遊幼生率が得られた。

さらに、液体窒素蒸気中における3つの冷却条件を比較した結果、凝固潜熱の放出が緩やかな条件で冷却後に保存した精子で解凍後の生残率が高かった。

凍結精子を用いて新鮮精子並みの受精率を得るためには、 10^8 精子/ $200 \mu\text{l}$ 以上の濃度で凍結した精子を1個の卵あたり 10^8 個以上の割合で媒精する必要があり、原精液の希釈は10~数10倍が限界と考えられた。

液体窒素中で4年間保存した精子は、短期保存の精子に比べ低い生残率を示し、長期保存による精子の劣化が推察された。しかし、これから得た幼生の正常D型幼生率と飼育6日目の生残率は各々78.0%, 77.4%であり、新鮮精液を用いた場合より下回りはしたものの実用に耐えうる値であり、飼育6日目の幼生の殻長(99.9 μm)も新鮮区(95.2 μm)に劣らず、長期保存

精子の実用性が確認された。

謝 辞

本稿を御校閲して頂き貴重な御指摘を賜った
東京大学農学部附属水産実験所黒倉寿博士に厚
く感謝いたします。

文 献

- Bougrier, S., and L. D. Rabenomanana, 1986:
Cryopreservation of spermatozoa of the Japanese oyster,
Crassostrea gigas. *Aquaculture*, **58**, 277-280.
- Franks, F. 1985: *Biophysics and Biochemistry at Low
Temperatures.*, Cambridge University Press. [村勢則
郎・片桐千仞訳, 1989: 低温の生物物理と生化学.
第1刷, 北海道大学図書刊行会, 札幌, 182 p.]
- 岩田仲弘・黒倉 寿・平野禮次郎, 1989: マガキ精液の
凍結保存. *水産増殖*, **37**(3), 163-166.
- Kurokura, H., K. Namba, T. Ishikawa, 1990: Lesions of
spermatozoa by cryopreservation in oyster *Crassostrea*

- gigas*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **56**(11): 1803-1806.
- Lannan, J. E., 1971: Experimental self-fertilization of the
Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, utilizing cryoprese-
rved sperm. *Genetics*, **68**, 599-601.
- Lindemann, C. B., J. A. O'Brien and F. J. Giblin, 1988: An
investigation of the effectiveness of certain antioxidants
in preserving the motility of reactivated bull sperm
models. *Biology of Reproduction*, **38**, 114-120.
- Mounib, M. S., 1978: Cryopreservation of fish and
mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, **53**, 13-18.
- 坂本幸哉, 1989: グルタチオン序説. 「グルタチオン」
(坂本幸哉・木下祝郎編) 講談社サイエンティ
フィック, 東京, 1-16.
- 四之宮重穂, 1989: 動物精液の凍結保存法一馬. 「凍結
保存—動物・植物・微生物—」(酒井昭編) 朝倉
書店, 東京, 146-147.
- 僧都 博, 1989: 微生物の凍結および乾燥障害と耐性.
「凍結保存—動物・植物・微生物—」(酒井昭編)
朝倉書店, 東京, 23-29.
- Yankson, K. and J. Moyse, 1991: Cryopreservation of the
spermatozoa of *Crassostrea tulipa* and three other
osyters. *Aquaculture*, **97**, 259-267.

1997年1月13日受理 (Accepted on January 13, 1997)

南西海区水産研究所業績 A 第55号 (Contribution No. A55 from the Nansei National Fisheries Research Institute)

薄 浩則・浜口昌巳・石岡宏子: 南西海区水産研究所 〒739-04 広島県佐伯郡大野町丸石 2-17-5 (H. Usuki, M. Hamaguchi, H. Ishioka:
Nansei National Fisheries Research Institute, 2-17-5 Maruishi, Ohno, Saeki, Hiroshima 739-04, Japan)