

短 報

トラフグ凍結精子の家庭用冷蔵庫での二次保存

細谷 将*・水野直樹*・城 夕香*・藤田真志*・鈴木 譲*・菊池 潔*

Secondary preservation of cryopreserved torafugu (*Takifugu rubripes*) sperm in a conventional refrigeratorSho HOSOYA, Naoki MIZUNO, Yuka JO, Masashi FUJITA,
Yuzuru SUZUKI and Kiyoshi KIKUCHI

Transfer of cryopreserved torafugu (*Takifugu rubripes*) sperm for commercial use has been established. Because of difficulties in rigorous ovulation control for this species, secondary preservation of the cryopreserved sperm might be required after delivery to hatcheries that are not equipped with deep freezers or liquid nitrogen tanks until the fish spawn. In this study, we tested the ability to keep cryopreserved sperm in a conventional freezer and fridge. Sperm directly transferred from a liquid nitrogen tank to the freezer became motionless within a day and fertilization ability within nine hours, whereas those thawed and kept in the fridge maintained motility over four days and could produce larvae even 72 hours after secondary preservation.

キーワード：トラフグ, 凍結精子保存, 二次保存

2014年6月9日受付 2015年1月8日受理

ゲノム情報を活用した育種研究の重要性がますます広く認識されつつあるが、その成果が水産分野でも実用化され始めた。その代表例はリンホシチス病耐性を持つヒラメ系統であり、このヒラメ種苗はすでに市場において大きなシェアを獲得している (Ozaki *et al.* 2012, Fuji *et al.* 2007)。今後は、多くの養殖魚種において優良系統が次々と生まれ、その種苗の流通が拡大すると予想される。さらには、畜産業界で行われているように (畜産技術協会 2004)、凍結精子を利用した優良品種の流通が一般的になる可能性も高い。先駆的な例としては、岐阜県河川環境研究所が県内の鮎養殖業者に対して子持ち鮎生産支援として行っている全雌化精液の販売があげられる。また、東京大学大学院農学生命科学研究科附属水産実験所 (以下、東大水産実験所) で作出された「超雄トラフグ」 (菊池ら 2013, Matsunaga *et al.* 2014) の凍結精子の提供も 2013 年から始まっている。

トラフグを始め、多くの魚種では水温や日長の管理、ホルモン処理などによる排卵誘導を行っても厳密に産卵日を決定することは容易ではない。したがって、凍結精子を生産現場に持ち込んでも、その日に卵が得られずに授精できない事態も起こり得る。そうならないためには、搬入した凍結精子の二次保存法について検討しておく必要があると考えられた。

本研究では、天然のトラフグ (*Takifugu rubripes*) を用いて、液体窒素容器や超低温冷蔵庫などが無い生産現場でも可能な方法として、家庭用冷蔵庫の冷凍室および冷蔵室での二次保存を検討した。最初に実験1では、冷凍室内での保存を試み、精子の能力を評価するために人工授精させて孵化率を求めた。次に実験2では、冷蔵室内での3日間の保存を試みた孵化実験を行った。実験3では、冷蔵室内で3日以上保存した精子の運動活性を評価した。

* 東京大学大学院農学生命科学研究科附属水産実験所

〒431-0214 静岡県浜松市西区舞阪町弁天島2971-4

Fisheries Laboratory, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, University of Tokyo, 2971-4 Bentenjima, Maisaka, Nishiku, Hamamatsu 431-0214, Japan

ahosoya@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

材料と方法

実験1：冷凍室での二次保存 2013年4月26日に敦賀港にて購入した天然トラフグを東大水産実験所まで陸送して実験に供した。すでに排精していた3尾の雄（個体A, B, C）から4月29日に精子を採取し、ストロー法（Kamada *et al.* 2008）で凍結精子を作製し、液体窒素で保存した。精子の保存液には、ジメチルスルホキシド（Dimethyl sulfoxide (DMSO), Wako）と非働化済みウシ胎児血清（Fetal bovine serum (FBS), Gibco 社）を1:9の割合で混合して用いた。精子に9倍量の保存液を添加し、穏やかな転倒混和を30回行って希釈した。精子に活性があることを確認したうえで、0.5 mLサイズのストロー精液管（富士平工業株式会社）に充填し、ストローパウダー（富士平工業株式会社）で封をした。ストローは液体窒素の液面で1分間冷却した後に液体窒素に沈め、液体窒素容器（XT-20, Taylor Wharton, 米国）で保存した。

この凍結精子を用いて、冷凍室（-24°C程度）で2日間の保存を試みた。雌個体の成熟過程をカニューレションで確認し、成熟の進行具合から産卵日を5月2日と予想した。4月30日の9時、15時、5月1日の9時、15時、5月2日の3時に、各個体の凍結精子をストロー3本ずつ液体窒素容器から出して、ポリ袋に入れて冷凍室に保存した。後述の媒精操作を行ったのは、5月2日の12時であったため、冷凍室での保存時間は、それぞれ51, 45, 27, 21, 9時間となった。

凍結精子の解凍は、各個体あたりストロー3本ずつを冷凍室から取り出し、20°Cの水をはったバットにストローのまま浮かべて行った。人工授精に先立って、解凍後の活性を顕微鏡下で確認したところ、9時間保存した精子には活性が認められたが、21時間保存した精子は、その場で痙攣したように首をふる精子はいたものの、前進運動する精子はなかった。保存時間が27時間以上の精子はどの個体でも活性がなかった。これらの結果を受け、9時間保存した精子と21時間保存した精子、および対照区として、液体窒素から出してそのまま20°Cの水で解凍した精子を用いて人工授精を行った。各ストローから18 μ Lの精子をとり、それぞれ直径9cmの滅菌済みプラスチックシャーレ中で1.0 gの卵と混ぜ、乾導法で人工授精させた。授精には20°Cの濾過海水を用いた。5時間後に卵100粒ずつを300mLの海水を入れた500mLのサンプル瓶に保存し、海水を毎日交換しながら孵化まで飼育した。

実験2：冷蔵室での二次保存 2014年4月28日に敦賀港にて購入した天然トラフグを東大水産実験所まで陸送して実験に供した。すでに排精していた3尾の雄個体（D, E, F）から5月6日に精子を採取し、上述の方法で液体窒素中に凍結保存した。5月7日の午後3時と5月9

日の午後3時に凍結精子を上述の方法で解凍した後、ストローのままポリ袋に入れて家庭用冷蔵庫の冷蔵室に保存した。5月10日に採卵できたので、午後3時にこの解凍精子を用いて乾導法で人工授精し、100粒の卵から上述の方法で孵化率を求めた。

実験3：冷蔵庫で3日以上保存した精子の運動能 実験1, 2とは異なるオス個体（G, H, I）から採精して凍結精子を作製し、精子の運動能を記録した。液体窒素から出した凍結精子を20°Cの水で解凍した後、家庭用冷蔵庫内に保存した。冷蔵庫に移してから76, 100, 124時間にあたる精子の運動能を精子運動比と運動時間から評価し、冷蔵庫での保存時間との関係について検討した。また、対照区として、液体窒素容器から出して解凍した直後の精子についても運動能を評価した。

運動能の評価は顕微鏡下で400倍の倍率で行った。スライドガラス上に9 μ Lの海水を取り、解凍した精子を0.3 μ L滴下し、素早く混合することで活性を賦与した。顕微鏡はLeica社製の光学顕微鏡（DM5000B）を用い、鏡筒にデジタルカメラ（DFC490）をつないでパソコンモニターに映し、それをSony社製ハンディカム（HDR-SR12）で録画して精子の運動を観察した。運動精子比は太田ら（1995）の方法により、6段階に区分して判定した。すなわち、活性を賦与してから10秒後に前進運動する精子の割合が75%以上の場合を「5+」、50-74%を「4+」、25-49%を「3+」、24%以下を「2+」、極めて少数の場合を「1+」、すべて動かない場合を「0」とした。また、精子を滴下した直後から活性を持つ精子が視界内でおおよそ5%になるまでの時間を運動時間とした。

結 果

実験1：冷凍室での二次保存 対照区では5割程度の孵化率だったのに対し、冷蔵庫で二次保存した場合、9時間保存区では平均4-14%と著しく低下しており、21時間保存区では孵化仔魚を得られず、孵化率は0%であった（図1）。各個体の平均値を用いて、保存時間の影響をKruskal-Wallis test ($n=3$, $\alpha=0.05$)で評価した。その結果、冷蔵庫での保存時間の延長とともに孵化率の有意な低下が認められた（ $P=0.024$ ）。

実験2：冷蔵室での二次保存 凍結精子を解凍したうえでストローのまま冷蔵保存した場合、対照区と同程度の孵化仔魚が得られた（図2）。個体Dの精子を用いた72時間保存区のみ14%程度と孵化率が低かったが、Kruskal-Wallis test ($n=3$, $P=0.177$)では対照区との間に有意差は確認されなかった。

実験3：冷蔵室で3日以上保存した精子の運動能 解凍後にストローのまま冷蔵保存した精子の運動時間は保存

トラフグ凍結精子の冷蔵保存

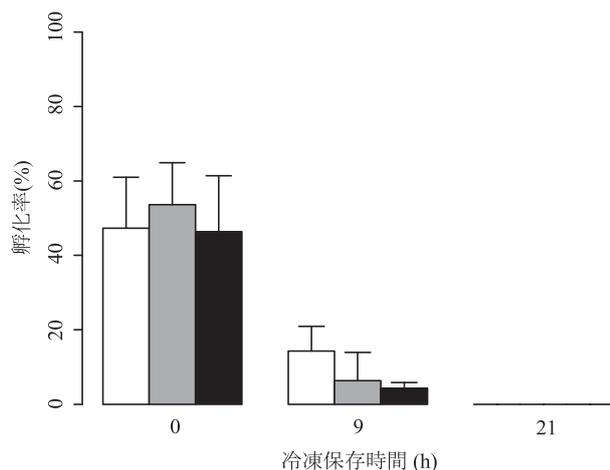


図1. トラフグ精子の冷凍室での保存時間と媒精後の孵化率(平均値±標準偏差). A, B, Cは個体の識別記号

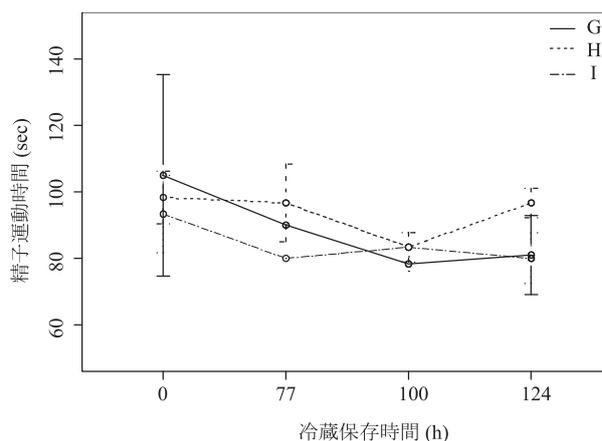


図3. 解凍精子の冷蔵室での保存時間と賦活後の精子運動時間(平均値±標準偏差). G, H, Iは個体の識別記号

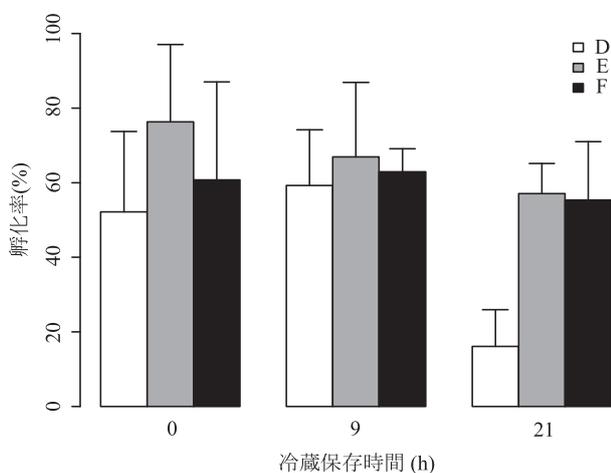


図2. トラフグ精子の冷蔵室での保存時間と媒精後の孵化率(平均値±標準偏差). D, E, Fは個体の識別記号

時間の経過とともに減少の傾向にあったものの(図3), 対照区と有意差はなかった(Kruskal-Wallis test, $P = 0.157$)。また, 精子運動比は, 100時間では「5+」が多かったが, 124時間では「4+」が増えており, 全体として運動能の低下が認められた(表1)。

考 察

トラフグの凍結精子を家庭用冷蔵庫の冷凍室に保存した場合, 1日以内に活性を失い, 孵化率も9時間以内に著しく低下した(図1)。このことから, 本種では冷凍室での二次保存は不可能あることが分かった。本実験で二次保存が不可能であったメカニズムは不明であるが, 冷凍室内の温度(-24°C)が動物細胞内で氷結晶が生成される-8°Cから-21°Cの温度帯(朝比奈1980)に近かったことが影響していると考えられる。したがって, これよりももっと低い温度を保つ冷凍庫であれば二次保存が可能かもしれない。一方, 解凍後に冷蔵保存した場合, 3日経過しても対照群と同程度の孵化仔魚を得られた(図2)。このことから, トラフグの凍結精子は, 搬入後, 家庭用冷蔵庫の冷蔵室に二次保存することが可能であることが示された。本研究では冷蔵室での4日以上二次保存は試せなかったが, 実験3で精子の運動能は4日目まで大きな変化がなく, 5日経過した場合に若干の劣化傾向が認められたことから(図3, 表1), 冷蔵室で二次保存の可能期間は3-4日程度と予想された。ただし, 個体D由来の精子では3日目に孵化率の低下が認められた。この結果から, この個体の精子は他の個体の精子

表1. 個体 G, H, I から得た凍結精子の冷蔵室での保存時間と賦活後の精子運動比が「5+」「4+」だった回数 (n=3)

	0h		77h		100h		124h	
	5+	4+	5+	4+	5+	4+	5+	4+
G	3	0	2	1	3	0	1	2
H	3	0	3	0	3	0	2	1
I	3	0	3	0	2	1	2	1

より質的に劣っていたことが示唆され、凍結前の精子の質によって保存可能期間が異なることも予想された。今後、凍結前の精子の運動能などから二次保存の可能時間を予測するモデル式などの開発が求められる。

以上のことから、トラフグの凍結精子は家庭用冷蔵庫で二次保存が可能であることが示された。生産現場に液体窒素容器や超低温冷凍庫など専用の道具が必ずしも必要ではないことは、凍結精子の使用を容易にする。また、凍結精子を搬入した日に卵が得られない、あるいは得られても過熟などで状態が思わしくなかった場合、近日に産卵が予定されている雌に使用できるなど計画に柔軟性が持てる。さらに、解凍精子を冷蔵発送できるため、輸送方法の選択肢も増える。育種研究の成果が蓄積されるにつれて、養殖業において凍結精子の流通は一般的になると予想される。今後、他魚種においても凍結精子の二次保存方法を含め、凍結精子の使用について利便性を増すような技術の開発が望まれる。

謝 辞

本研究を行うに当たり、凍結精子の作製やカニューレション等の技術をご指導いただいた独立行政法人水産総合研究センター増養殖研究所 鈴木重則氏にこの場を借りてお礼を申し上げます。

引用文献

- 朝比奈英三 (1980) 生体の組織と細胞における氷晶形成. 凍結及び乾燥研究会誌, **26**, 46-51
- 畜産技術協会 (2004) 牛の人工授精マニュアル .151pp
- FUJI, K., O. HASEGAWA, K. HONDA, K. KUMASAKA, T. SAKAMOTO, N. OKAMOTO (2007) Marker-assisted breeding of a lymphocystis disease-resistant Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, **272**, 291-296.
- KAMADA Y., Y. MORIMOTO, K. YOKOI, S. SUZUKI, H. OHTA (2008) Cryopreservation of tiger puffer sperm. *水産増殖*, **56**, 648.
- 菊池 潔・細谷 将・田角聡志 (2013) 魚類の性統御. *アクアネット*, **16**, 42-47.
- MATSUNAGA, T., R. IEDA, S. HOSOYA, M. KUROYANAGI, S. SUZUKI, H. SUETAKE, S. TASUMI, Y. SUZUKI, T. MIYZDAI, K. KIKUCHI (2014) An efficient molecular technique for sexing tiger pufferfish (fugu) and the occurrence of sex-reversal in a hatchery population. *Fish. Sci.*, **80**, 933-942.
- 太田博巳・楠田 聡・工藤 智 (1995) シンチャモ精巢精子の運動活性. *日本誌*, **61**, 7-12.
- OZAKI, A., K. ARAKI, H. OKAMOTO, M. OKAUCHI, K. MUSHIAKE, K. YOSHIDA, T. TSUZAKI, K. FUJI, T. SAKAMOTO, N. OKAMOTO (2012) Progress of DNA marker-assisted breeding in maricultured finfish. *Bull. Fish. Res. Agen.*, **35**, 31-37.