

サケの発眼率とスパマトクリット, pH および 精子運動時間との関係

宮本 幸太^{1*}・高橋 史久²・佐田 巖³・羅津 三則⁴・小松 信治⁵・
桑木 基靖⁶・徳田 裕志⁷・吉田 昇⁸・伴 真俊²

¹ 独立行政法人水産総合研究センターさけますセンター千歳事業所

² 独立行政法人水産総合研究センターさけますセンター

³ 独立行政法人水産総合研究センターさけますセンター渡島事業所

⁴ 独立行政法人水産総合研究センターさけますセンター八雲事業所

⁵ 独立行政法人水産総合研究センターさけますセンター帯広事業所

⁶ 独立行政法人水産総合研究センターさけますセンター十勝事業所

⁷ 独立行政法人水産総合研究センターさけますセンター北見事業所

⁸ 独立行政法人水産総合研究センターさけますセンター斜里事業所

Relationship between spermatocrit, pH, sperm motility and eyed egg ratio in chum salmon (*Oncorhynchus keta*)

KOUTA MIYAMOTO^{*1}, FUMIHISA TAKAHASHI², IWAO SADA³, MITSUNORI RATSU⁴,
SHINJI KOMATSU⁵, MOTOYASU KUWAKI⁶, HIROSHI TOKUDA⁷, NOBORU YOSHIDA⁸
AND MASATOSHI BAN²

¹Chitose Field Station, National Salmon Resources Center, Fisheries Research Agency, Rankoshi 9-ban, Chitose, Hokkaido 006-0068, ²National Salmon Resources Center, Fisheries Research Agency, Nakanoshima 2-jo 2-chome, Toyohira-ku, Sapporo, Hokkaido 062-0922, ³Oshima Field Station, National Salmon Resources Center, Fisheries Research Agency, Sakaemachi 94-2, Yakumo, Hokkaido 049-3117, ⁴Yakumo Field Station, National Salmon Resources Center, Fisheries Research Agency, Kamiyakumo-59ban, Yakumo, Hokkaido 049-3121, ⁵Obihiro Field Station, National Salmon Resources Center, Fisheries Research Agency, Taisyo 441-55, Obihiro, Hokkaido 089-1242, ⁶Tokachi Field Station, National Salmon Resources Center, Fisheries Research Agency, Aza-seo 428-3, Sarabetsu, Hokkaido 089-1552, ⁷Kitami Field Station, National Salmon Resources Center, Fisheries Research Agency, Aoba 6-8, Kitami, Hokkaido 090-0018, ⁸Shari Field Station, National Salmon Resources Center, Fisheries Research Agency, Aza-kounan 807-17, Kiyosato, Hokkaido 099-4404 Japan

Abstract We investigated the relationships between eyed egg ratio, sperm motility, seminal fluid pH, spermatocrit and ovarian fluid pH in chum salmon (*Oncorhynchus keta*) by path analysis, to determine an index for improvement of the fertilization rate. There are positive correlations among the semen parameters, but only sperm motility explained the high percentage of variance in the eyed egg ratio. Our results suggest that fertilization rates were elevated by extension of sperm motility, and this phenomenon

* E-mail: mkouta@fra.affrc.go.jp. Tel: 0123-23-2804. Fax: 0123-23-2449.

occurred when the seminal fluid pH and spatocrit alike were elevated. Also we propose that sperm motility is the most useful way to forecast the eyed egg ratio.

Key words : シロザケ, 精子活性, pH, スパマトクリット, 発眼率

サケ人工増殖事業において、不受精などにより発生する死卵は、水生菌の発生源となり、生卵の斃死を招くことから、人工種苗生産の成績向上と安定化をはかる上で授精作業は特に注意すべき作業工程と考えられる。現在、増殖事業において、人工授精を行う際に注意する点としては、精液の色、卵の感触、潰卵や血液、胆汁などの混入の有無がある（水産庁北海道さけ・ますふ化場、1985）。このような感触や視覚による判別方法は、瞬時に判断出来るという利点はあるものの、数値化された基準がないこと、個人の経験に大きく左右されること、第三者への確に伝達することが困難であるなどの欠点もある。また、サケ人工増殖事業において、採卵から放流までに生じる減耗の約60%は発眼期以前に生じていることから（宮本ら、2009）、感覚のみに依存した現状の判別方法は十分とは言えず、発眼率向上のためには新たな指標の開発が必要と考えられる。これまでにニジマス（Lahnsteiner *et al.*, 1998 ; Geffen and Evans, 2000 ; Ciereszko and Dabrowski, 1994）、ベニサケ（Hoysak and Liley, 2001）および大西洋サケ（Aas *et al.*, 1991 ; Hwang and Idler, 1969 ; Gage *et al.*, 2004）のサケ科魚類において、精子の活性、密度、ATP、精液のpHおよび精漿の浸透圧といった指標を用いて、発眼率に与える影響を評価する試験が行われてきた。一方、雌の体腔液についても精子の活性を高める作用を持つことが知られており（野村、1964 ; Ginsburg, 1968）、近年では体腔液のpHが精子の活性を左右することが明らかとなっている（Wojtezak *et al.*, 2007）。このような報告から、雌の体腔液が受精に影響を与えることも十分に予想される。そこで、本調査では比較的簡易な装置で測定が可能であり、短時間で判別をつけることが出来る精液のpH、スパマトクリット、体腔液のpHおよび精子活性の一つである精子運動時間を指標として、発眼率との関係を検討した。

材料および方法

調査場所と標本採集

本試験は2007年11月17日に水産総合研究センター

さけますセンター八雲事業所（以下、八雲事業所とする）で行った。供試魚には、八雲事業所構内で捕獲した雌雄各10尾のサケ親魚と、社団法人渡島さけ・ます増殖事業協会遊楽部ふ化場（以下、遊楽部ふ化場とする）（Fig. 1）から輸送した雌雄各10尾のサケ親魚の計40個体を用いた。

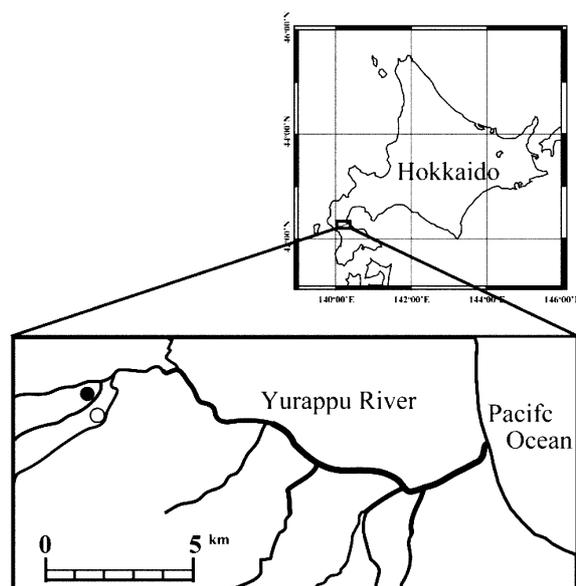


Fig. 1 Map showing the National Salmon Resources Center Yakumo field (●) and Yurappu salmon hatcheries (○) in Yurappu River.

採卵・採精を行う際には、精液や体腔液に血液や尿などの体液の混入が無いことを確認してから、OAKTON社製 pH Spear により精液と体腔液のpHを測定した。なお、調査時の室温は終始8.2～9.3℃であった。精液のpHの測定は、圧搾した精液を冷やしたシャーレの中に入れ、直ちに行った。体腔液のpHは、割腹の際に卵ごと体腔液をカップに採集し、直ちに測定を行った。精子の運動能力を判定するための精子運動時間は、精液1μlをスライドグラス上に採り、その上から水300μlを滴下して良く攪拌した後に素早くカバーグラスを載せ、顕微鏡（OLYMPUS社製CX41 N-11）視野下の全数の精子が首振り活動を停止するまでの時間とした。なお、精液の希釈から測定までに要した時間は

5秒以内であった。精子運動時間の測定は1個体につき3回行い、その平均値を使用した。精子の密度を把握するため、精液をヘマトクリット毛細管(CAPILLARY社製EMマイスターヘマトクリット毛細管)へ入れ、遠心分離器(KUBOTA社製インバータ・ヘマトクリット遠心機3220)にて12000/sec回転で5分間の遠心分離を行った後、分離した精漿と精子の割合を計測することで精液中の精子占有率であるスパマトクリットを計算した。なお、スパマトクリットの測定については、1個体につき2回行い、その平均値を使用した。

授精実験は、雌雄1個体毎に卵200粒と精液約20mlを採取して、1対1の乾導法により授精を行った。精液と卵は媒精時に良く攪拌した後、ただちに増収型アトキンス式ふ化槽に入れて60分間吸水させた。その後、別の増収型アトキンス式ふ化槽に卵を入れ替え、同年12月14日の積算温度246℃時点まで、孵化槽内の供試卵から白濁した死卵を取り除いて発眼卵を計数し、発眼率を次式により求めた。

$$\text{発眼率 (\%)} = (\text{発眼卵数} / \text{供試卵数}) \times 100$$

統計解析

本試験では、雄1個体の精液につきpH、スパマトクリットおよび精子運動時間の3つの分析項目を指標として採用した。これらの指標は相互に関係し合うことが想定されるため、指標間の関係性と影響を同時に明らかにすることができる共分散構造分析(Li, 1986)の一手法であるパス解析を用いて指標と発眼率との関係を明らかにした。雄の指標である精液のpH、精子運動時間およびスパマトクリットと、雌の指標である体腔液のpHは発眼率に影響をおよぼすと仮定し、発眼率へ単方向のパスを設定した。また、精液の指標はそれぞれが関与し合うと仮定し、双方向のパスを設定した。モデルの評価は、モデル全体の評価とモデルの部分評

価の2段階をふまえて行った(小塩, 2004)。モデル全体の評価では、まず χ^2 検定でモデル全体が正しいかどうかを検定した。モデルがデータと完全に適合している場合は乖離度(χ^2)が0となり、有意水準を5%として、有意確率が0.05以上であればそのモデルは指標と一致していると判断した。モデル適合度の指標として、CFI(比較適合度指標)、RMSEA(平均二乗誤差平方根)を用い、CFIが0.9以上、RMSEAが0.05未満をモデル適合の基準とした。予測変数が内生変数の分散を説明する割合を示すため、予測精度の尺度として R^2 を用いた。モデルの部分評価とふ化場間における指標の統計的有意性の有無を確認するため、 χ^2 -testとStudent's t-testを用い、 $p < 0.05$ を有意と判断した。なお、データの正規分布が仮定されない場合は、Mann-Whitney's U testを用いて $U < \text{下側有意点}$ を有意と判断した。

結 果

授精実験に使用した両ふ化場の雄親魚20個体における精液のpHは6.9~8.2、スパマトクリットは22±7.9(平均値±標準偏差)%, 精子運動時間は76.8±25.9秒、雌親魚20個体における体腔液のpHは7.7~8.2であった。授精させた20組の卵の発眼率は88.2±18.0%であった(Table 1)。なお、八雲事業所と遊楽部孵化場との間で、卵の発眼率($U = 39$, 下側有意点23)、精液のpH($p = 0.7$)、スパマトクリット($U = 37$, 下側有意点23)、精子運動時間($p = 0.1$)および体腔液のpH($p = 0.3$)に有意差は認められなかった。

パス解析の結果、モデル全体はデータと一致しており($p > 0.05$)、CFIは0.997、RMSEAは0.034と容認できる値を示した。モデルの部分評価の結果、精液のpHと精子運動時間($p < 0.01$)、精液のpHとスパマトクリット($p < 0.01$)および精子運動時間とスパマトク

Table 1 Mean (X), standard deviation (s.d.), minimum (min) and maximum (max) values of traits

Traits	N	X	s.d.	min	max
Eyed Egg (%)	20	88.2	18.0	36.0	99.6
Semen					
Sperm Motility Time (sec)	20	76.8	25.9	0.0	106.8
Seminal Fluid pH	20	7.5	0.4	6.9	8.2
Spermatocrit (%)	20	22.0	7.9	9.5	39.5
Egg					
Ovarian Fluid pH	20	8.0	0.1	7.7	8.2

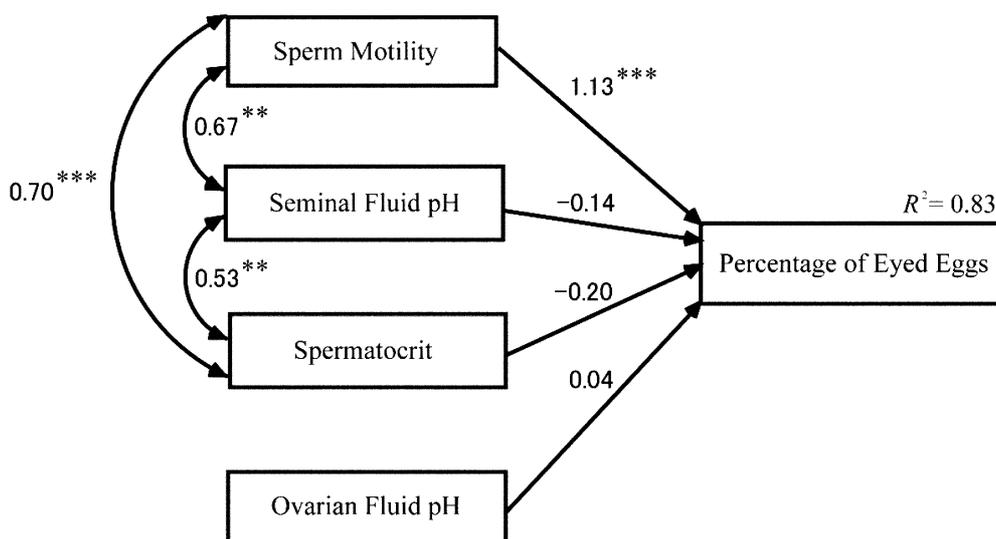


Fig. 2 Path diagrams illustrating the relationships among sperm motility, seminal fluid pH, spermatocrit, ovarian fluid pH and percentage of eyed eggs. Numerals indicate a standard partial regression coefficient or correlation coefficient and asterisks indicate statistical significance (χ^2 -test, *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$). Comparative fit index (CFI) = 0.997. Root mean square error of approximation (RMSEA) = 0.034.

リット ($p < 0.001$) との間には有意な正の相関関係が認められ、発眼率との関係については、精子運動時間のみが有意な関係 ($p < 0.001$) にあり、予測変数の精度を示す R^2 は 0.83 であった (Fig. 2)。

考 察

パス解析の結果、精子運動時間のみが発眼率の変動を 80% 程度説明出来ることが明らかとなった。この結果より、精子運動時間は発眼率に最も影響を与える要因であると考えられた。一方、スパマトクリットや精液の pH については発眼率への影響は認められないものの、それぞれの指標間に正の相関関係が認められた。精巣内で形成された精子は、精巣を出て輸精管へと移動する際に、 $17\alpha, 20\beta$ dihydroxy-4-pregnen-3-one の作用により精液内の重炭酸塩が上昇し (Miura *et al.*, 1992)、精漿中の pH が上昇すると言われている (Morisawa and Morisawa, 1988)。Ingermann *et al.* (2002) は、ニジマスやマスノスケから採取した精液をあらゆる pH の人工精漿に 2 時間浸し、活動する精子の割合を測定したところ、7.25 ~ 8.2 の範囲内では、pH の上昇に従い活動する精子の割合が高くなることを明らかにしている。また、人工緩衝液 (Baynes *et al.*, 1981; Billard and Cosson, 1988) や体腔液 (Wojtezak *et al.*, 2007) でも、pH が 7.0 ~ 8.2 内の範囲であれ

ば pH の上昇に従って精子の活動時間や活動率、および鞭毛の活動が向上することを報告している。このように精子については、精巣内から放精された状態に至るまで、周辺の環境の pH が高いほど活性が向上することがわかる。本研究結果もほとんどの精液の pH が 7.0 ~ 8.2 の範囲内にあり、精液の pH と精子運動時間の間には正の相関関係が認められていることから、上記の報告と一致する結果となった。その他にも、スパマトクリットと精液の pH は正の相関関係にあり、精子密度の増加に対応するように精液の pH も共に上昇した結果と考えられる。これらのことから、精液の pH とスパマトクリットが共に高い状態であれば、授精の際に活発な精子が多く存在するため、高い発眼率が得られると考えられる。

これまでの研究には、精子運動時間が発眼率に反映しないこと (Hoysak and Liley, 2001; Aas *et al.*, 1991) や、精子密度の増加が精子の活動率を下げる (Kurokura and Oo, 2008) といった報告がある。これらの報告の背景には、精子の活性化への基盤となる高い精子密度とアルカリ性の環境という条件が成立していなかったと考えられる。受精率が変動する原因を明らかにするためには、本調査のように複数の指標を分析して指標間の因果関係を総合的に評価することが必要であろう。また、精液の pH、スパマトクリット、精子運動時間は、体腔液の pH に比べて個体差が大きかつ

た。Munkittrick and Moccia. (1987) はニジマスを使用した試験結果から、繁殖期の経過に伴い、精子の活動率とスパマトクリットが低下することを報告している。今回、調査に供したサケ親魚は、遡上時期、捕獲場所および蓄養期間が異なるため河川内での成熟期間に差が生じていた可能性は捨てきれず、このため精液の指標にばらつきが生じたものと推察される。いずれにせよ、これらの原因については今後さらに追及していく必要があると考えられる。

一方、体腔液の pH は個体間変動が小さく、8.0 付近で安定していた。体腔液の pH については、7.5 ~ 8.0 までの間では pH の上昇に従い精子の活性が向上することが報告されている (Perchee *et al.*, 1993)。パス解析の結果、体腔液の pH は発眼率に影響を与えていなかったが、今回の実験に用いた全ての雌の体腔液は pH が 8.0 付近で安定していたことから、媒精後の精子にとっていずれも好適な環境だったと推察される。これより、調査環境下では雌の指標が発眼率へ及ぼす影響は無かったと考えられる。

今回の結果から、精液の判別を行い精子運動時間の高い精液を使えば、発眼率向上を図ることが可能と考えられる。しかし、サケ人工増殖事業の場合、1 日に人工授精に供する雄親魚は、多い場合で 1000 個体以上と膨大なため、親魚 1 個体毎に指標の値を評価していくことは現実的ではない。そこで、サケ人工増殖事業では、授精に供する親魚の群から複数個体を抽出し、それらの指標の測定結果から、授精への使用の可否を判断する方法が最も有効と考えられる。今後は、精子運動時間の測定が、考察された方法で事業規模にてどの程度有効であるのかを明らかにすることが必要となる。

要 約

1. サケの発眼率と精液の pH, スパマトクリット, 精子運動時間および体腔液の pH との関係パス解析により評価した。
2. 精子運動時間のみに発眼率との間で有意な関係が認められ、精子の運動時間が長いと受精率が高くなることが明らかとなった。
3. スパマトクリットや精液の pH については発眼率への影響は認められないものの、それぞれの指標間に正の相関関係が認められた。
4. 精液の pH とスパマトクリットが共に高い状態であ

れば、授精の際に活発な精子が多く存在するため、高い発眼率が得られると考えられた。

謝 辞

本研究を実施するに際して、社団法人渡島さけ・ます増殖事業協会遊楽部孵化場の皆様には供試魚を提供していただいた。さけますセンター千歳事業所の清水勝所長、本間広巳チーフ技術専門員および伊藤洋満技術専門員を含む職員の皆様には有益な助言をいただいた。記して厚くお礼申し上げます。

文 献

- Aas, G. H., Refstie, T. and Gjerde, B. (1991). Evaluation of milt quality of Atlantic salmon. *Aquaculture*, **95**, 125-132.
- Baynes, S. M., Scott, A. P. and Dawson, A. P. (1981). Rainbow trout, *Salmo gairdnerii* Richardson, spermatozoa: effects of cations and pH on motility. *Journal of Fish Biology*, **19**, 259-267.
- Billard, R. and Cosson, M. P. (1988). Sperm motility in rainbow trout, *Parasalmo gairdneri*; Effects of pH and temperature. In: Breton B, Zohar Y, editors. Reproduction in fish Basic and Applied Aspects in Endocrinology and Genetics. INRA, Paris, 161-167.
- Ciereszko, A. and Dabrowski, K. (1994). Relationship between biochemical constituents of fish semen and fertility: the effect of short-term storage. *Fish Physiology and Biochemistry*, **12**, 357-367.
- Gage, M. J. G., Macfarlane, C. P., Yeates, S., Ward, R. G., Searle, J. B. and Parker, G. A. (2004). Spermatozoal traits and sperm competition in atlantic salmon: relative sperm velocity is the primary determinant of fertilization success. *Current Biology*, **14**, 44-47.
- Geffen, A. J. and Evans, J. P. (2000). Sperm traits and fertilization success of male and sex-reversed female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, **182**, 61-72.
- Ginsburg, A. S. (1968). Fertilization in fishes and the problem of polyspermy. pp. 365., Izdatel' stvo Nauka (Translated from Russian)
- Hoysak, D. J. and Liley, N. R. (2001). Fertilization dynamics in sockeye salmon and a comparison of

- sperm from alternative male phenotypes. *Journal of Fish Biology*, **58**, 1286-1300.
- Hwang, P. C. and Idler, D. R. (1969). A major study on cations, osmotic pressure and pH in seminal components of Atlantic salmon. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, **26**, 413-419.
- Ingermann, R. L., Bencic, D. C. and Gloud, J. G. (2002). Low seminal plasma buffering capacity corresponds to high pH sensitivity of sperm motility in salmonids. *Fish Physiology and Biochemistry*, **24**, 299-307.
- 小塩真司 (2004). SPSS と Amos による心理・調査データ解析 ～因子分析・共分散構造分析まで～. 東京図書, 東京, 180-181.
- Kurokura, H. and Oo, M. K. (2008). Evaluation of fertilizing capacity of cryopreserved rainbow trout sperm. *Fisheries Science*, **74**, 621-626.
- Lahnsteiner, F., Berger, B., Weismann, T., and Patzner, R. A. (1998). Determination of semen quality of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by sperm motility, seminal plasma parameters, and spermatozoa metabolism. *Aquaculture*, **163**, 163-181.
- Li, C. C. (1986) Path analysis — a primer. 4 th ed. The Boxwood press, Pacific Grove, Calif.
- Miura, T., Yamauchi, K., Takahashi, H. and Nagahama, Y. (1992) The role of hormones in the acquisition of sperm motility in salmonid fish. *Journal of Experimental Zoology*, **261**, 359-363.
- 宮本幸太・平澤勝秋・宮内康行・戸叶 恒 (2009). サケ人工増殖における親魚捕獲, 蓄養および受精作業の現状と問題点. *水産技術*, **1**(2), 29-38.
- Morisawa, S. and Morisawa, M. (1988). Induction of potential for sperm motility by bicarbonate and pH in rainbow trout and chum salmon. *Journal of Experimental Zoology*, **136**, 13-22.
- Munkittrick, K. R. and Moccia, R. D. (1987). Seasonal changes in the quality of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) semen: effect of a delay in stripping on spermatocrit, motility, volume and seminal plasma constituents. *Aquaculture*, **64**, 147-156.
- 野村 稔 (1964). ニジマスの人工採卵に関する基礎研究—VI. 淡水・等調液・体腔液・尿の希釈による精子の活動性と精液の貯蔵について. *日本水産学会誌*, **30**, 723-733.
- Perchee, G., Cosson, J., Andre, F. and Billard, R. (1993). Sperm motility of trout (*Oncorhynchus mykiss*) and carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Applied Ichthyology*, **9**, 129-149.
- 水産庁北海道さけ・ますふ化場 (1985). さけ・ます人工孵化事業実施要領. 辻孔版社, pp.14.
- Wojtezak, M., Dietrich, J. G., Słowińska, M., Dobosz, S., Kuźmiński, H. and Ciereszko, A. (2007) Ovarian fluid pH enhances motility parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Aquaculture*, **270**, 259-264.