

# ヒラメ・カレイ類精液の凍結保存

## 第2報 凍結保存精子を用いたヒラメ・カレイ類の交雑

齊藤 節雄\*

Cryopreservation of flatfish sperm

II. Artificial hybridization among flatfish using cryopreserved sperm

Setsuo SAITOH\*

Scanning electron microscope observations on eggs of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*), and cryopreserved spermatozoa in seven species of flatfish, Japanese flounder, Pacific halibut (*Hippoglossus stenolepis*), barfin flounder (*Verasper moseri*), brown sole (*Pleuronectes herzensteini*), crest head flounder (*Pleuronectes schrenki*), marbled flounder (*Pleuronectes yokohamae*) and slime flounder (*Microstomus achne*). One micropyle which average diameter was 5 to 7  $\mu$ m on the surface of egg was opened and spiral structure was observed in micropyle tunnel and many pits were present on the egg surface. The external shape of spermatozoa of seven species of flounder was closely resembled one another. The spermatozoa of those species had almost round-shaped head, a middle piece, and a long tail. Measurements of head length, head width, and tail width of each spermatozoon were done, but there were no significant difference ( $p>0.01$ ). The present result indicated at least these six species of flounder sperm could run through the micropyle of Japanese flounder egg. Hybridizations among flatfish were attempted by artificial insemination and chromosome manipulation technique using Japanese flounder eggs and cryopreserved flatfish sperm, but embryo forming and hatching rates were extremely low and no hybrid fish was produced.

キーワード： 凍結保存, 精子, 異体類, 交雑

### まえがき

交雑は成長性, 耐病性, 飼料効率等に関していわゆる雑種強勢が期待されるため, 育種研究の手法として作物<sup>1)</sup>, 家畜<sup>2)</sup>では古くから用いられて来た。魚類では, コイ類<sup>3)</sup>, サケマス類<sup>4)</sup>等淡水魚で報告されているが, 近年海産魚においても, ブリ類, タイ類, フグ類等<sup>5)</sup>で種間, 属間雑種が作出され, 養殖品種として実用化されつつある。しかし, ヒラメ・カレイ類においては, この様な取り組みは極めて少なくヨーロッパ産dab, plaice, flounder等<sup>7-11)</sup>を用いた基礎的な研究があるに過ぎない。

ヒラメ・カレイ類を材料に交雑を行う際に問題となる, 精子頭部及び卵門の大きさを走査型電子顕微鏡により観

察した。また, 前報<sup>12)</sup>で報告したヒラメ・カレイ類精子の凍結保存法を用い, 長期間保存した精子を用いてヒラメ卵に受精することにより交雑を試みたので報告する。

### 材料と方法

#### 1. ヒラメ卵およびカレイ類精子の走査型電子顕微鏡による観察

1995年島牧産人工ヒラメ親魚5~6個体から搾出した成熟卵および1993年から2~3年間液体窒素中に凍結保存したヒラメ・カレイ類精子を材料に, 走査型電子顕微鏡観察試料を作成した。未受精卵については, 搾出後直ちに2.5%グルタルアルデヒド(カコジル酸緩衝液pH7.4)

報文番号 A389 (2005年7月19日受理)

\* 北海道立栽培漁業総合センター (Hokkaido Institute of Mariculture, Shikabe, Hokkaido 014-1404, Japan)

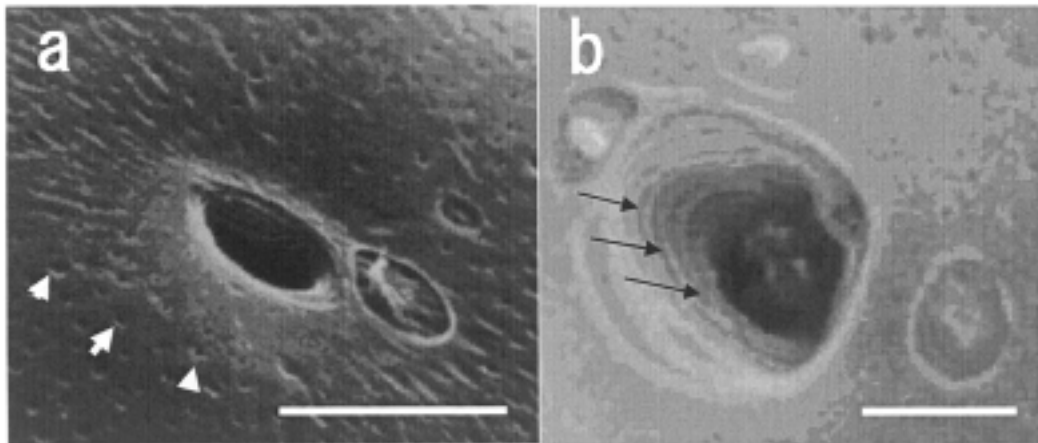


Fig.1 Scanning electron micrograph of micropyle in Japanese flounder (a). Pit structure (arrow heads) on the surface of egg. Scale bar =  $10\mu\text{m}$ . High magnification of micropyle (b). Spiral structure (arrows) in micropyle tunnel. Scale bar =  $4\mu\text{m}$

で4時間固定した。その後精子のサンプルと同様の処理を施し、走査型電子顕微鏡により観察した。ヒラメ・カレイ類精子については、前報<sup>12)</sup>で報告したのと同様に、液体窒素中に凍結保存してあるヒラメ、オヒョウ、マツカワ、マガレイ、マコガレイ、クロガシラガレイ、ババガレイの7魚種の精子を120mM NaHCO<sub>3</sub>で解凍した後、直ちに0.1Mカコジル酸緩衝液2.5~5.0%グルタルアルデヒドで室温にて4時間固定した。その後7%サッカロースを含む0.1Mカコジル酸緩衝液で洗浄し、エタノール脱水した後tブチルアルコールに置換し、 $-30^{\circ}\text{C}$ で凍結後直ちにフリーズドライヤー(日立, ES-2030型)で乾燥させた。イオンスパッター(日立, E-1010型)で白金パラジウムを蒸着した後、走査型電子顕微鏡(日立, S-2460N型)で加速電圧15~25kVにて観察した。走査型電子顕微鏡により観察した精子の写真を元に、30個の精子に対して頭長(頭部の先端から中片部の付け根まで)、頭幅及び尾の幅を計測した。

## 2. ヒラメ卵と凍結保存カレイ類精子を用いた異質倍数体の作出

前報<sup>12)</sup>で報告したのと同様の方法で凍結保存してあるカレイ類精子を、ヒラメ卵に媒精することで雑種の作出を試みた。1995年島牧産人工ヒラメ親魚5~6個体から搾出した成熟卵および1993年から2~3年間液体窒素中に凍結保存したヒラメ・カレイ類精子を材料に異質倍数体の作出を行った。異質二倍体は、凍結融解したカレイ類精子を媒精することで作出し、異質三倍体は、媒精後2分後にバイオプレス(大岳製作所, 5615-L型)を用いて $600\text{kg}/\text{cm}^2$ で5分間加圧処理することで第2成熟分裂

阻止により三倍体化した。一方異質四倍体は、同様に媒精後60分後に $600\text{kg}/\text{cm}^2$ で5分間処理することで第1卵割阻止により作出した。ヒラメ未受精卵1.0g(約1,500粒)に、ペレット法で凍結したカレイ精子ペレット3個(新鮮精液 $60\mu\text{l}$ に相当)を、 $20^{\circ}\text{C}$ に調整した1mlの120mM NaHCO<sub>3</sub>液中で解凍後媒精した。使用したカレイ精子は、オヒョウ、マツカワ、マガレイ、マコガレイ、クロガシラガレイ、ババガレイの6魚種である。

## 結果

### 1. ヒラメ卵とカレイ類精子の走査型電子顕微鏡による観察

Fig.1a,bにヒラメ未受精卵の卵門の走査電顕像を示した。ヒラメの卵門は、その周辺に隆起など特別な構造はなく、漏斗の緩やかな部分は極僅かで、直ちにトンネル部と成り卵門腔に通じていた。卵門開口部はほぼ円形をしており、直径 $5\sim 7\mu\text{m}$ であった。トンネル部の直径は約 $5\mu\text{m}$ であり、ヒラメ精子の頭部の幅は $2.0\mu\text{m}$ 以下なので、精子の通路としては十分な広さであった。卵門周辺は多数の小孔(pit)で囲まれているのが観察されたが、卵門開口部周縁は平坦であった(Fig.1a)。一方トンネル部の内腔面には、層状構造が認められた(Fig.1b)。

Fig.2に、ヒラメの他6魚種のカレイ類精子頭部の走査電顕像を示した。ヒラメ・カレイ類においては、少なくともこれら7魚種に関しては、精子の形態及び大きさは共に極めて良く類似していた。精子頭部は球形又は砲弾型であり、中片部にはミトコンドリア球が7~9個認められ、尾部へと続いていた。

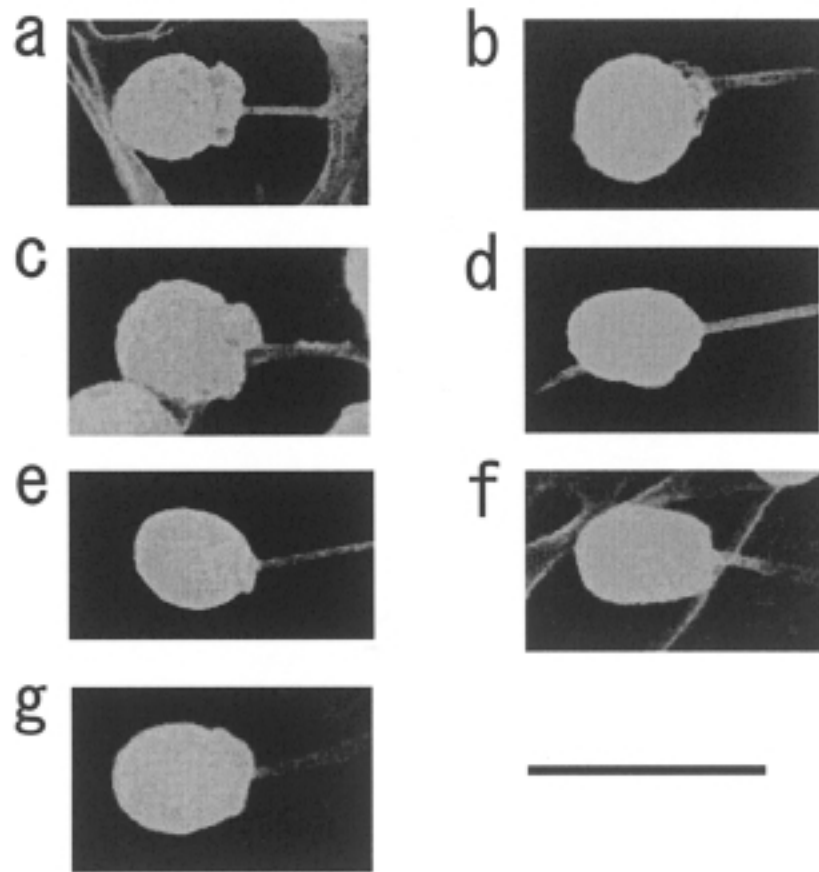


Fig.2 Scanning electron microscopy images of flounder sperms. a: *P. olivaceus*, b: *H. stenolepis*, c: *V. moseri*, d: *P. herzensteini*, e: *P. yokohamae*, f: *P. schrenki*, g: *M. achne*. Scale bar = 2  $\mu$ m.

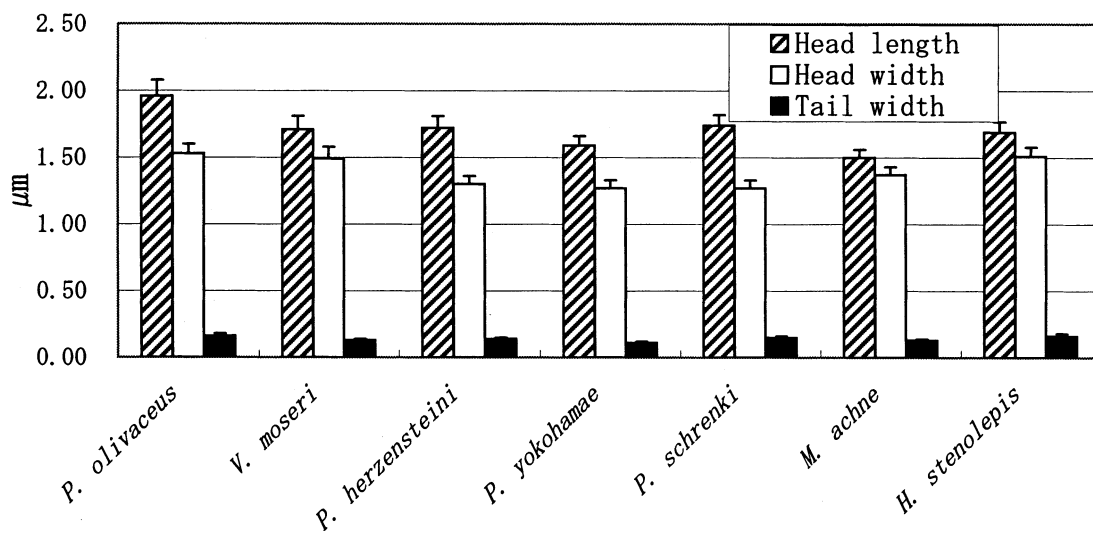


Fig.3 Measurements of head length, head width and tail width of spermatozoa for seven species of flounders. There were no significant difference ( $P > 0.01$ ) in any of the measured parts of the spermatozoa. Vertical bar indicates the standard deviation of the mean.

Fig.3にヒラメ・カレイ類精子頭部の長径, 短径, 尾の幅の計測結果を示した。長径は平均で1.89~1.64 $\mu$ mでヒラメが最も大きく, 短径は1.68~1.32 $\mu$ mで, オヒョウが最も大きかった。しかしヒラメ精子と比較して, いずれのカレイ類精子頭部の大きさとの間に有意な差はなかった(t-検定  $P>0.01$ )。一方尾の幅についても, 0.19~0.16 $\mu$ mで, 若干の違いはあるものの, 頭部と同様有意な差ではなかった。

場合, 胚体形成率は異質二倍体が1.8%, 異質三倍体が0.8%, 異質四倍体が0.4%であった。孵化率はそれぞれ1.0%, 0.2%, 0%と低率であった。マガレイ精子をヒラメ卵に媒精した場合, 胚体形成率は, 0.2~2.7%, 孵化率は0~1.5%であった。同様にして, マコガレイ精子では, 胚体形成率0.3~1.1%, 孵化率は0.1~0.5%, クロガシラガレイ精子では, 胚体形成率0~1.3%, 孵化率0~0.5%, ババガレイ精子では, 0~0.3%と0~0.1%, オヒョウ精子では, 0~0.1%と0~0.1%といずれも極めて低率であった。

2. ヒラメ雌×カレイ類雄の交雑魚の作出

ヒラメ卵に凍結保存したカレイ精子を媒精し, その後加圧処理により異質倍数体を作成した。Fig.4とFig.5に人工受精および染色体操作後の受精卵における胚体形成率と孵化率を示した。マツカワ精子をヒラメ卵に媒精した

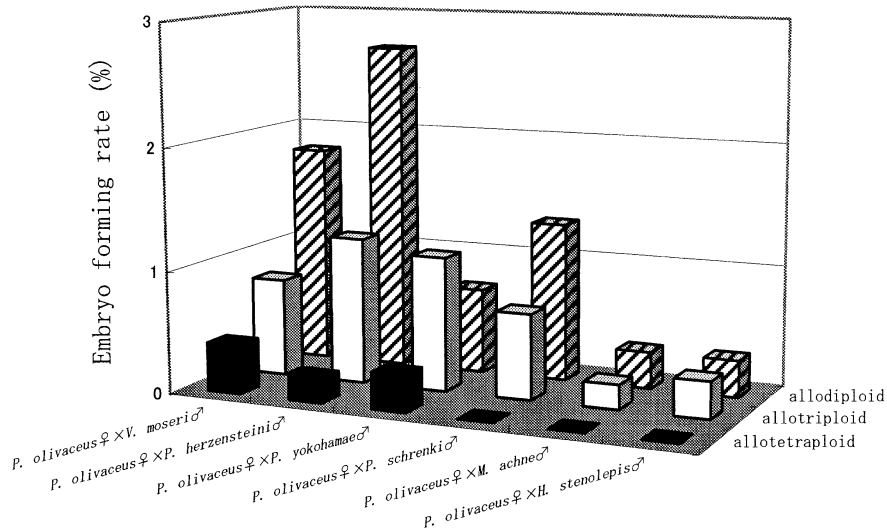


Fig.4 Embryo forming rate of hybrids among flatfish produced by chromosome manipulation.

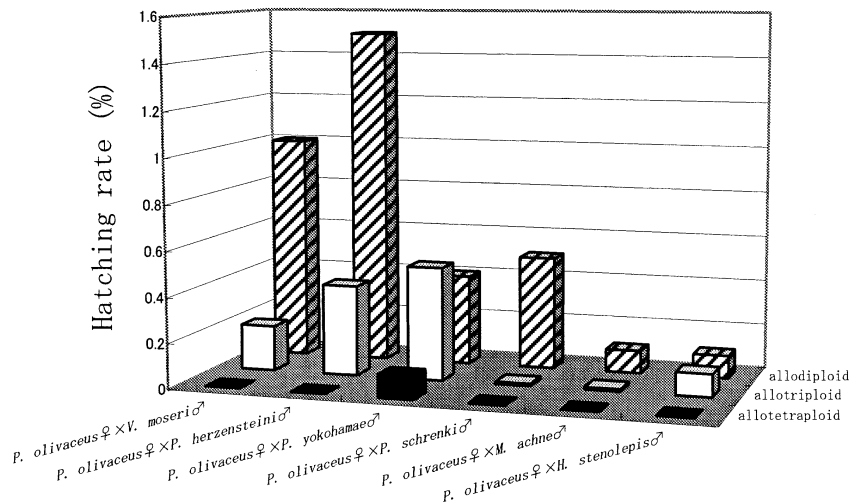


Fig.5 Hatching rate of hybrids among flatfish produced by chromosome manipulation.

## 考 察

### 1. ヒラメ卵およびカレイ類精子の微細構造

硬骨魚類の卵には、受精の際精子の通路となる卵門が存在し<sup>13)</sup>、精子は卵門を持たない多くの動物の様に卵膜を溶かしながら貫通する必要のないことが知られている。ヒラメの卵門は、その周辺に隆起など特別な構造はなく、イシガレイ<sup>14)</sup>と同様卵門周辺は平坦で、メダカ等<sup>15)</sup>で見られる漏斗状の卵門に比べ、漏斗の緩やかな部分は極僅かで、マダイ<sup>16)</sup>と同様に直ちにトンネル部と成り囲卵腔に通じていた。卵門の内腔面には幅約1 $\mu$ mの5～6層の層状構造が見られ、トンネル部分にも数層の層状構造が見られた。卵門漏斗部の外縁の最大径は、5～7 $\mu$ mで、トンネル部の径約2.5～2.8 $\mu$ mであった。カレイ類精子頭部の大きさは頭長が1.50～1.72 $\mu$ mで頭幅が1.27～1.51 $\mu$ mであり、大きさに種差は認められなかった。一方、ヨーロッパ産のplaiceやflounderの精子頭部の直径を測定した報告<sup>10)</sup>においても、平均1.5～1.6 $\mu$ mであり、本研究結果とほぼ同様であった。従って、カレイ類精子がヒラメ卵の卵門を通過し、受精に至ることは十分可能と考えられた。ヒラメ・カレイ類の間で異種間交雑を行う場合、カレイ類精子がヒラメ卵の卵門を通過出来るか否かという問題があるが、本魚種の場合は物理的に受精可能と判断された。

### 2. ヒラメ・カレイ類の交雑

ヒラメ・カレイ類における雑種作出の研究としては、dab(♀)×flounder(♂)<sup>7)</sup>やplaice(♀)×flounder(♂)<sup>8,10)</sup>等がある。しかし本邦産異体類における報告は、一部<sup>11)</sup>を除いて殆ど無い。一般に異種間あるいは属間交雑においては、通常二倍体は致死性であることが多い<sup>3,4)</sup>。しかし、染色体操作により、三倍体、四倍体という様に、倍数性を上げて行くと生存性を回復することが報告されている<sup>9)</sup>。本研究では凍結保存精子を利用し、ヒラメ卵に数種のカレイ類精子を媒精させ、倍数体作出を試みたが、胚体形成率、孵化率ともに極めて低率で、実際に交雑魚の作出には至らなかった。これには、ヒラメ卵の卵質や凍結保存に使用したカレイ類精子の活性等の問題が考えられた。

カレイ類の新鮮精液を用いてヒラメ卵に受精させた場合、凍結保存精子を使用した場合に比べて、胚体形成率および孵化率共に向上した(著者未発表)。新鮮マガレイ精子を使用した場合、凍結精子に比べて胚体形成率が約10倍に、孵化率が約5倍程度増加し、孵化仔魚が多数得られた。今後、凍結保存精子を使用した異質倍数体作出率の向上と倍数性の確認、更に異質倍数体魚の飼育試験を行う必要があると考えられた。

## 要 約

1. ヒラメ卵とヒラメ精子及びカレイ類(オヒョウ、マツカワ、マガレイ、クロガシラガレイ、マコガレイ、ババガレイ)精子を走査型電子顕微鏡で微細構造を観察した。ヒラメ・カレイ類7魚種の凍結保存精子については、形態および大きさともに類似していた。精子の頭長、頭幅および尾部の幅について、各魚種間で計測結果に有意な差は認められなかった。ヒラメ卵とこれら6魚種の精子を用いて異種間交雑を行うことは、物理的に可能と判断された。

2. ヒラメ雌×カレイ類雄による交雑を試みた。凍結保存したカレイ類精子を使用し、ヒラメ卵に人工受精後、染色体操作による異質倍数体の作出を行った。しかし何れのカレイ類精子を媒精した場合においても、受精卵の胚体形成率、孵化率共に極めて低率なため作出には至らなかった。

## 文 献

- 1) 鵜飼保雄：育種学小史. 植物育種学. 交雑から遺伝子組換えまで. 東京大学出版会, 東京, 2003, pp. 2-26
- 2) 猪 貴義：雑種強勢の利用. 新家畜育種学(水間 豊, 猪 貴義, 岡田育穂, 佐々木義之, 東條英昭, 伊藤晃, 西田 朗, 内藤 充著), 朝倉書店, 東京, 1996, pp. 110-116
- 3) 鈴木 亮：育種学的にみた魚類の交雑. 日水誌. 32(8). 677-688 (1966)
- 4) 寺尾俊郎：サケ属魚類, 特にサケおよびヒメマスの人工交雑と育種に関する研究. 北海道立さけ・ます孵化場研報. 25, 1-101 (1970)
- 5) 荒井克俊：異質倍数体. 水産増養殖と染色体操作(鈴木 亮編), 恒星社厚生閣, 東京, 1989, pp. 82-94
- 6) 村田 修, 家戸敬太郎：海産魚類の養殖技術の現状と課題—交雑魚. 最新海産魚の養殖(熊井英水編著), 湊文社, 東京, 2000, pp. 18-30
- 7) Riley, J. D. and Thacker G. T. : New intergeneric cross within the Pleuronectidae, dab × flounder. *Nature*, 221, 484-486 (1969)
- 8) Purdom, C. E. : Induced polyploidy in plaice (*Pleuronectes platessa*) and its hybrid with the flounder (*Platichthys flesus*). *Heredity*, 29, 11-24 (1972)

- 9) Lincoln, R. F.: The growth of female diploid and triploid plaice (*Pleuronectes platessa*) and plaice × flounder (*Platichthys flesus*) hybrids over one spawning season. *Aquaculture*, 25, 259-268 (1981)
- 10) Lincoln, R. F.: Sexual maturation in triploid male plaice (*Pleuronectes platessa*) and plaice × flounder (*Platichthys flesus*) hybrids. *J. Fish Biol.*, 19, 415-426 (1981)
- 11) Kim, K., Bang, I. C. Kim, Y. K. Nam, Y. K., and Kim, D. S.: Early survival and chromosomes of intergeneric hybrids between Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* and spotted halibut *Verasper variegatus*. *Fish. Sci.* 62(3), 490-491 (1996)
- 12) 齊藤節雄：ヒラメ・カレイ類精液の凍結保存 第1報ベレット法とストロー法. 北水試研報. 48, 9-17 (1996)
- 13) 高野和則：卵巢の構造と配偶子形成. 水族繁殖学 (隆島史夫・羽生 功編), 緑書房, 東京, 1989, pp. 3-24
- 14) Hirai, A.: Fine structures of the micropyle of pelagic eggs of some marine fishes. *Jap. J. Ichthyol.*, 35(3), 351-357 (1988)
- 15) 細川和子：メダカの卵門の走査電子顕微鏡による観察. 魚類学雑誌. 26(1), 94-99 (1979)
- 16) 細川和子, 伏見 徹, 松里寿彦：マダいの卵膜表面の電子顕微鏡的観察. 魚類学雑誌. 27(4), 339-343 (1981)

# ヒラメ・カレイ類精液の凍結保存 第3報 クローンヒラメ偽雄精子の長期保存

齊藤節雄<sup>\*1</sup>, 森 立成<sup>\*2</sup>

Cryopreservation of flatfish sperm

III. Long-term preservation of sperm from sex reversed gynogenetically induced clone Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)

Setsuo SAITOH<sup>\*1</sup> and Tatsunari MORI<sup>\*2</sup>

Hatching rates of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) eggs inseminated by the cryopreserved or fresh sperm from sex reversed clonal Japanese flounder were compared. Hatching rates increased with the number of straw or pellet when using cryopreserved sperm frozen by straw or pellet method. And they were over the values of using fresh semen when four straws or four pellets were applied to the insemination. Abnormal fry rates using cryopreserved semen were not so different compared with them using fresh ones. Hatching rates of eggs inseminated by the cryopreserved sperm which were stored under the three different cryopreserved temperatures, -80°C (deep freezer), -150°C (deep freezer) and -196°C (LN<sub>2</sub>) for about one year were examined for comparison. In case of -80°C, hatching rates of eggs inseminated by cryopreserved semen were zero, but when preserved at -150°C, they were almost as same as when stored in LN<sub>2</sub>.

キーワード：ヒラメ，クローン，偽雄精子，凍結保存

## まえがき

雌性発生を利用して作出されたクローン魚は遺伝的に全て雌であり，その一部の魚を雄に性転換（偽雄）しておけば，雌のクローン魚と普通に交配するだけでクローン系統が維持される<sup>1)</sup>。一度作出された優良な形質を持ったクローン系統を途絶えることなく維持するために，毎回偽雄を作ることは手間の掛かる作業である。また数多くの系統を何世代にも渡って継代飼育することは，施設の維持や飼育コストの面，あるいは事故等により系統が消滅する危険性もあり困難である。

現在受精卵を丸ごと凍結保存することは，技術的に確立されていない<sup>2)</sup>。しかし精子の場合は，凍結した状態で長期間ほとんど半永久的に保存が可能であり，畜産分野では既に実用化されている<sup>3)</sup>。第1報<sup>4)</sup>において，液体

窒素を用いたヒラメ・カレイ類の精子凍結保存法におけるペレット法及びストロー法の有効性について報告した。今回は，ヒラメのクローン魚の系統保存を目的に，クローンヒラメの偽雄精子の長期保存法について検討し，保存温度及び精液量と孵化率の関係について若干の知見が得られたので報告する。

## 材料および方法

(実験 I) 液体窒素保存容器（サーモライン，BioCane34）の液体窒素中にペレット法あるいはストロー法で凍結保存した精液を，クローンヒラメの未受精卵1.0gに受精させ，その後孵化率を調べた。孵化率の算出には，ヒラメ未受精卵1.0gを1,500粒として換算した。0.5mlの120mM NaHCO<sub>3</sub>をスピッツ管に取り，凍結したストロー又はペ

報文番号 A390 (2005年7月19日受理)

\*1 北海道立栽培漁業総合センター (Hokkaido Institute of Mariculture, Shikabe, Hokkaido 014-1404, Japan)

\*2 北海道立中央水産試験場 (Hokkaido Central fisheries Experimental Station, Yoichi, Hokkaido 046-8555, Japan)

レットを投入し、直ちにボルテックスし解凍した。搾出した未受精卵1.0gに解凍した精子を媒精し、円筒状の孵化ネット（直径20~10cmのゴース地）に収容し、微流水とした。水温15℃に保ち、3日後に孵化仔魚を計数した。正常な外見のものを正常孵化仔魚とし、体が屈曲する等したものを奇形仔魚とした。解凍するペレット又はストローの数を1から5としたが、未受精卵は1.0gで一定にした。新鮮精液は、ペレット1個及びストロー1本に相当する精液量である20 $\mu$ lに統一した。

(実験Ⅱ) 実験Iと同様に、凍結保存精子をヒラメ未受精卵に媒精した後孵化率を調べた。液体窒素中に1~2年保存中の精子を、ディープフリーザーに移し、保存温度

を変えて試験した。液体窒素中で-196℃に、ディープフリーザーで-150℃及び-80℃の3段階とした。保存期間は約1年間とした。

結果

(実験Ⅰ) 液体窒素中に凍結保存していた精子を様々な個数解凍し、1.0gの未受精卵に媒精させた後の孵化率及び孵化仔魚の奇形率をFig.1及びFig.2に示した。ペレット法の場合、解凍した精子ペレットの数が増えるに従って、孵化率は直線的に増加し、5個の場合最高の89.3%であった。一方、ペレット3個では孵化率49.1%であっ

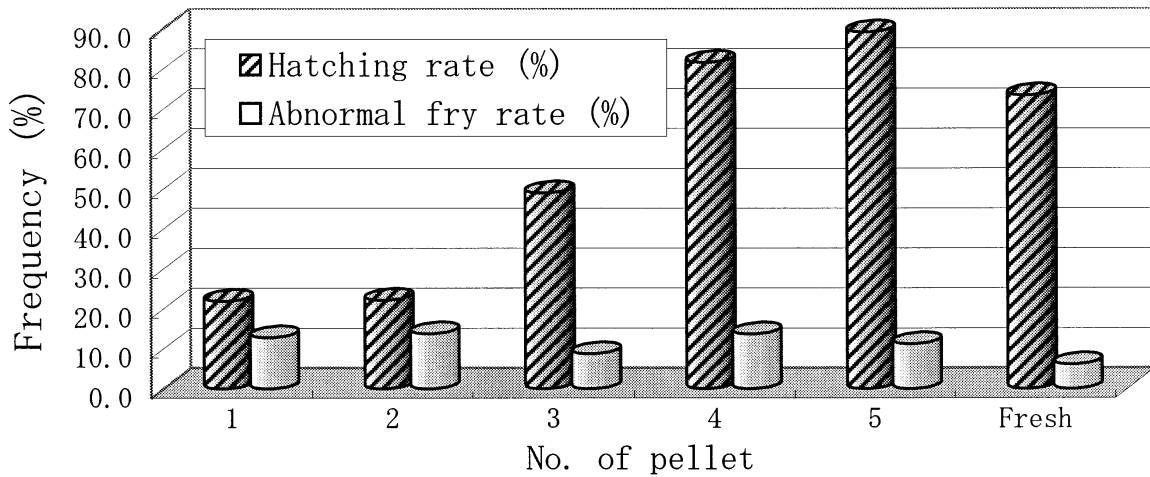


Fig.1 Hatching rate and abnormal fry rate of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) eggs inseminated by cryopreserved sperm frozen by pellet method.

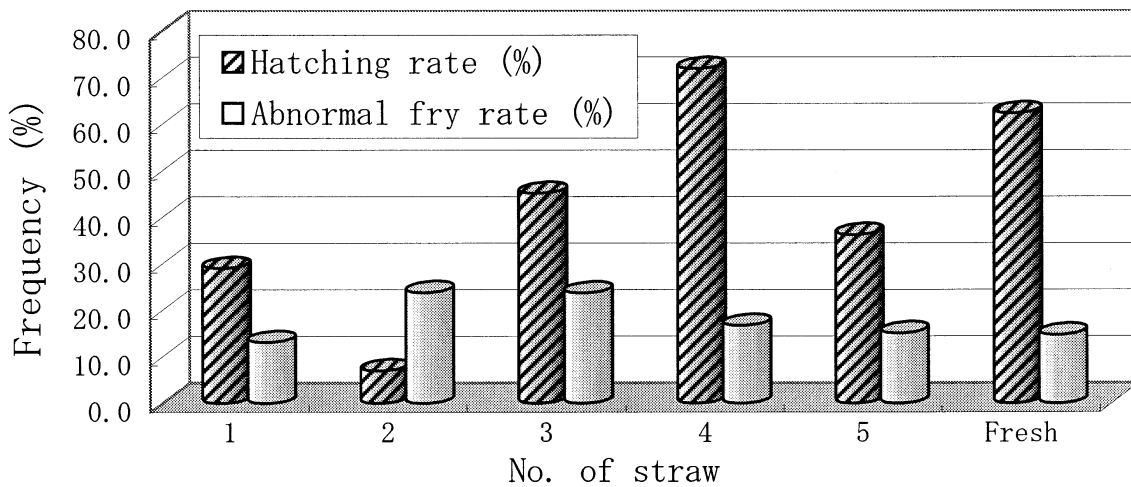


Fig.2 Hatching rate and abnormal fry rate of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) eggs inseminated by cryopreserved sperm frozen by straw method.



たが、4個では81.7%であり、これは、新鮮精液の73.5%を上回る値であった(Fig.1)。また、ストロー法においても、ストローの数の増加に伴い、孵化率も増加した。若干低い孵化率の場合もあったが、少なくともストロー4本で、新鮮精液を使用した場合の孵化率を上回った(Fig.2)。孵化仔魚の奇形率については、ペレット法の場合8.8~13.8%、ストロー法の場合は13.1~23.8%であり、多少バラツキがあったが、ストロー法の方が若干高い値であった。しかし、新鮮精液を使用した場合も、6.1~14.7%であり、凍結保存精子の場合と大きな違いはなかった。

(実験Ⅱ) 凍結保存温度を変えて約1年間保存した後、解凍した精液を未受精卵に媒精させ、その後の孵化率を調べた結果をFig.3とFig.4に示した。-80℃のフリーザー中に保存した場合は、ペレット法及びストロー法ともほとんど孵化仔魚が得られなかった。これに対して、-150℃のフリーザーを使用した場合は、ペレット法では、ペレット3~4個使用したとき孵化率が約30%となり、液体窒素中に保存した場合の孵化率とほぼ同等の結果であった(Fig.3)。一方、ストロー法では、孵化率は常に液体窒素の場合を上回り、3本解凍し受精させた時82.0%と最高値を示した(Fig.4)。

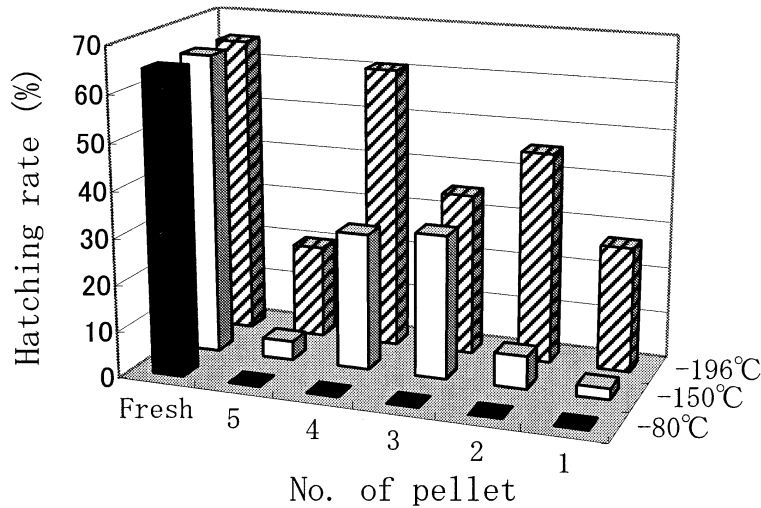


Fig.3 Effect of different storage temperatures of cryopreserved sperm frozen by pellet method on hatching rates of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) eggs.

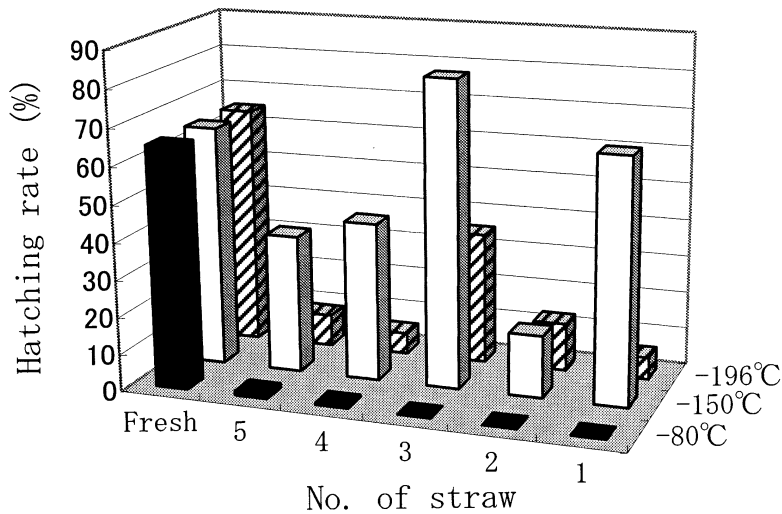


Fig.4 Effect of different storage temperatures of cryopreserved sperm frozen by straw method on hatching rates of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) eggs.

## 考 察

本研究により、新鮮精液量の約4倍量の凍結精子を確保しておけば、通常的人工受精により作出される孵化仔魚数が得られると考えられた。また、液体窒素だけでなく、 $-150^{\circ}\text{C}$ の超低温フリーザーにおいても少なくとも1年間の期間であれば、精子の凍結保存が可能であり、孵化率を指標とした精子活性は、液体窒素中での保存と比較して何ら遜色ないものであった。通常液体窒素を用いた保存では、特製の容器とその保存スペースを必要とし、定期的に液体窒素を補充する必要がある。ディープフリーザーを使用すれば、液体窒素は不要となり、狭いスペースで大量の保存が可能となる。従って、凍結精子を利用した大量種苗生産も現実味を帯びてくる。クローンヒラメの系統保存のみならず、優良系統を利用した養殖魚の生産に偽雄凍結保存精子の利用が期待される。

ヒラメの場合、卵量 $1.0\text{g}$ で約 $1,500$ 粒に相当し、新鮮精液 $20\mu\text{l}$ を媒精した時、本研究結果から約 $1,000$ 尾の孵化仔魚が得られた。従って、凍結精液は新鮮精液の4倍量が必要と仮定すると、 $100$ 万尾の孵化仔魚を得るには、約 $1,000\text{g}$ の未受精卵が必要なため、新鮮精液にして $20\mu\text{l} \times 1,000 = 20\text{ml}$ 必要となり、凍結保存精液は $20 \times 4 = 80\text{ml}$ となる。凍結する際は、凍結保護剤(DMSO)とリンゲル液(pH6.0)の混合液で精液を5倍に希釈するため、 $80 \times 5 = 400\text{ml}$ のボリュームが必要となる。ペレット1個又はストロー1本毎に $0.1\text{ml}$ ずつ希釈精液を凍結するので、作成されるペレット及びストローの数は、 $400\text{ml} / 0.1\text{ml} = 4,000$ 個(本)となる。 $0.1\text{ml}$ 容のペレット或いは牛精液保存用ストロー管( $0.5\text{ml}$ 容)を使用した場合に、 $4,000$ 個のペレットの容積を約 $3\text{l}$ 、 $4,000$ 本のストローの容積を約 $5\text{l}$ と試算すると、現在市販されているディープフリーザー( $-150^{\circ}\text{C}$ )の容量は約 $120\text{l}$ であるから、 $100$ 万尾の孵化仔魚をペレット法では $120 / 3 = 40$ 回、ストロー法では $120 / 5 = 24$ 回得るのに足る量の凍結精子の収納が可能と考えられる。

種苗生産現場においては、雌雄の生殖周期の不一致による精液不足、採卵用親魚の数が少ない事による遺伝的多様性低下の問題、更にウイルス病の診断結果が出るまで精液を保存しておく技術等が必要である。これまでニジマス・アマゴ<sup>®</sup>等淡水魚、マツカワ・ホシガレイ<sup>®</sup>等海産魚において、精液の短期保存法としての液状保存法が検討され、1週間から10日間程であればその後の人工受精に使用出来る技術となっている。しかし、それ以上の長期保存となるとやはり凍結保存技術が必要となる。新鮮精液を使用した時と同様な受精率、孵化率が得られ、種苗生産の現場に適應するためには、今回の実験を更に

現場向きに洗練することが必要である。凍結及び解凍操作の効率化を目指した機械化、自動化も課題と考えられる。

## 要 約

1. 凍結保存したクローンヒラメ偽雄精子と新鮮精液とで、未受精卵に受精させた時の孵化率と孵化仔魚の奇形率を比較した。ストロー法又はペレット法で凍結保存したクローンヒラメ偽雄精子のストローの本数あるいはペレットの個数を増やした場合、ストローで4本、ペレットで4個使用した時に、新鮮精液を使用した時の孵化率を上回った。一方、孵化仔魚の奇形率は、凍結保存精子を使用した場合も、新鮮精液の場合もほとんど違いはなかった。

2. 凍結保存温度を変え約1年間保存したクローンヒラメ偽雄精子と、新鮮精液を使用した場合の孵化率を比較した。 $-80^{\circ}\text{C}$ では、ストロー、ペレット共に数を多くしても孵化率はほとんどゼロであった。これに対して $-150^{\circ}\text{C}$ で保存した場合は、ストロー法、ペレット法共に液体窒素中に保存した場合と比較して遜色なかった。

## 文 献

- 1) 山本栄一：バイオテクノロジー．ヒラメの生物学と資源培養(南 卓志・田中 克編)，恒星社厚生閣，東京，1997，pp. 83-85.
- 2) 楠田 聡：魚類精子と胚細胞の凍結保存における現状と展望(総説)．水産育種．34，1-25(2004)
- 3) 水間 豊：家畜育種の沿革．新家畜育種学(水間 豊，猪 貴義，岡田育穂，佐々木義之，東條英昭，伊藤晃，西田 朗，内藤 充著)，朝倉書店，東京，1996，pp. 1-12.
- 4) 齊藤節雄：ヒラメ・カレイ類精液の凍結保存 第1報 ペレット法とストロー法．北水試研報．48，9-17(1996)
- 5) 宇野将義，井野川仲男，黒倉 寿：ニジマス・アマゴの人工授精への保存精液の利用Ⅱ 液状保存精液の精子活力と授精能力．水産増殖．34(2)，107-111(1986)
- 6) 持田和彦，有瀧真人，太田健吾，渡辺研一，大久保信幸，松原孝博：マツカワおよびホシガレイ精子の短期保存．北水研報告．64，25-34(2000)