

1. 研究課題名：真珠貝精液の凍結保存技術の開発
2. 研究機関：田崎真珠株式会社
3. 研究者：鬼木 浩
4. 研究協力者：榎原邦臣、藤田 文（田崎真珠株式会社）
5. 研究期間：平成8年1月16日から平成8年12月31日まで
6. 要約

アコヤガイ精液の凍結保存技術の開発にあたっては、まず浸透圧の観点から、最適希釈液の検討を始め、DMSO濃度、その平衡時間、冷却速度、予備凍結温度、最終凍結温度、融解・融解後の生残率及び受精能力について研究を進めた。その結果、10%DMSOを含む2/3人工海水中で、毎分9の冷却速度で-70まで冷却した後、液体窒素中に浸漬し、凍結保存後速やかに取り出し、25の2/3海水中で融解する方法によって高い受精率(92.2%)が得られた。この方法で得たアコヤガイ幼生を30日間飼育した結果、生残率・成長に異常は認められなかった。さらに、35日間液体窒素中に保存した凍結精液を用いて、アコヤガイ種苗生産に初めて成功した。また、その生産量は80万貝で現在も順調に生育中であり、現場で充分応用できる技術であることが明らかになった。走査型電子顕微鏡によるアコヤガイ凍結精子の形態に関する知見も得られた。

7. 研究目的

近年、水産分野でも、魚類の精液を凍結保存するための技術開発が急速に進み、サケ・マス類を中心に種苗生産への応用も試みられている。一方、海産無脊椎動物の精液凍結保存技術に関する研究例は、ウニ・カキ・アワビの数種にすぎず、真珠貝精液の凍結保存技術の開発に関する研究は皆無に等しい。しかし、真珠貝は日本の水産養殖業上の重要種であり、品質の高い真珠の生産を目的としているため、系統保存・育種等に応用される技術の開発が望まれている。これを受けて、本研究では、真珠貝精液の凍結保存条件を検討し、アコヤガイの凍結精液を用いて種苗の生産を試みた。

8. 材料と方法

[供試材料]

本研究では、田崎真珠株式会社（長崎県佐世保市）の養殖系統から選んだアコヤガイ（*Pinctada fucata*）の雌雄各8個体を実験に供した。これらのアコヤガイは、生殖巣を完熟させるために陸上施設で20日間蓄養した。

[精液の採取]

アコヤガイの精液採取法として最も簡便な切開法を用いた。採取前に貝殻の付着物を取り除き、洗浄後軟体部を損傷することなく剥身し、はさみで鰓や心臓を取り除きメスを用いて切り刻み、にじみ出る精液をビーカー等に採取した。

[精液の希釈]

採取した精液にA液及びB液を添加して希釈した。精子密度は血球計算盤を用いて1mlあたり 5×10 個程度になるように希釈した。

[ストローへの分注と封入]

0.5ml 牛精液用ストローに希釈終了後の精液を分注，封入した。封入はストロー上端を熱して押しつぶすが，精液の温度の上昇を防ぐため 15mm 程度の空間をつくった。

[凍結及び保存]

封入後の精液は，液体窒素蒸気を冷媒にしたプログラムフリーザーを用いて冷却した。ストローは横に並べて置き，冷却終了後は直ちに液体窒素保存容器に入れ保存した。

[融解及び媒精]

液体窒素保存容器からストローを速やかに取り出し，25℃ に維持した 2/3 海水中に 30 秒間浸漬して融解した。

[精子の生存率]

凍結、解凍後の精子の生存率はトリパンブルー染色法により計算した。

[精子の形態観察]

アコヤガイの新鮮精子と凍結精子の形態を走査型電子顕微鏡で観察した。希釈した 5% グルタルアルデヒド溶液を試料と等量加えて固定し，緩衝液としてサッカロースを 0.25M となるように加えた。

[受精率]

1/1500N アンモニア媒精法により媒精した桑実胚の全卵数に対する百分率を受精率とした。

9. 結果

[最適希釈液]

希釈液の濃度が凍結精液の精子生存率と新鮮な卵に媒精したときの受精率に及ぼす影響を調べた。その結果、2/3 海水で希釈し冷却、解凍したものにおいて精子生存率、受精率が最も高い値を示した。希釈率が高まるにつれて精子生存率、受精率が低下した。(図 1)。

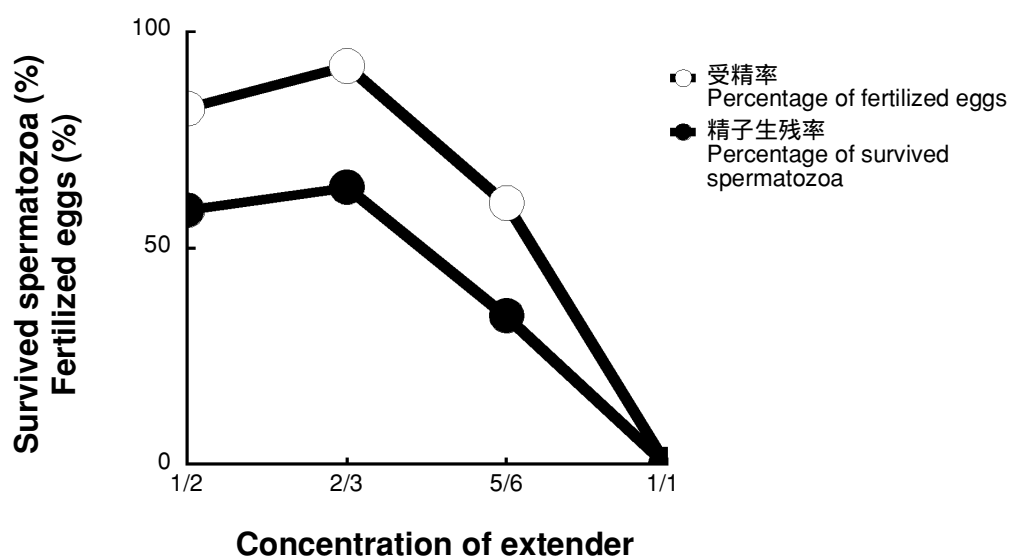


図 1 希釈液の濃度が凍結精液の精子生存率と新鮮な卵に媒精した時の受精率に及ぼす影響

[凍害防御剤]

凍害防御剤である DMSO の濃度が凍結精液の精子生残率と新鮮な卵に媒精したときの受精率に及ぼす影響を調べた。その結果、10%DMSO 濃度で最も高い精子生残率と受精率を示した。DMSO 濃度の上昇に伴い精子生残率と受精率は低下した (図 2)。

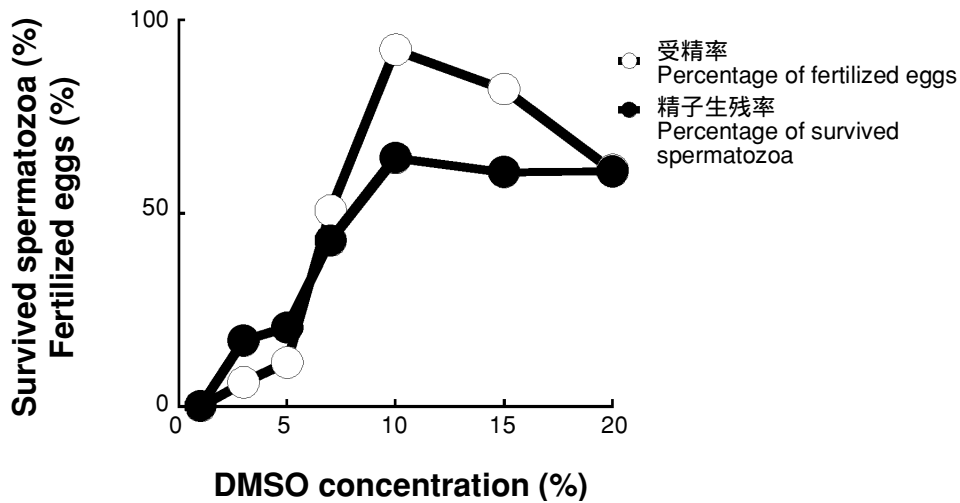


図 2 DMSO の濃度が凍結精液の精子生残率と新鮮な卵に媒精した時の受精率に及ぼす影響

Fig. 2 *Effect of concentration of DMSO on the percentage of survived spermatozoa and percentage of fertilized eggs after insemination with the sperm .

[冷却速度]

冷却速度が 9 /min で最も高い精子生残率と受精率を示した。冷却速度の増加に伴い精子生残率と受精率は低下した (図 3)。

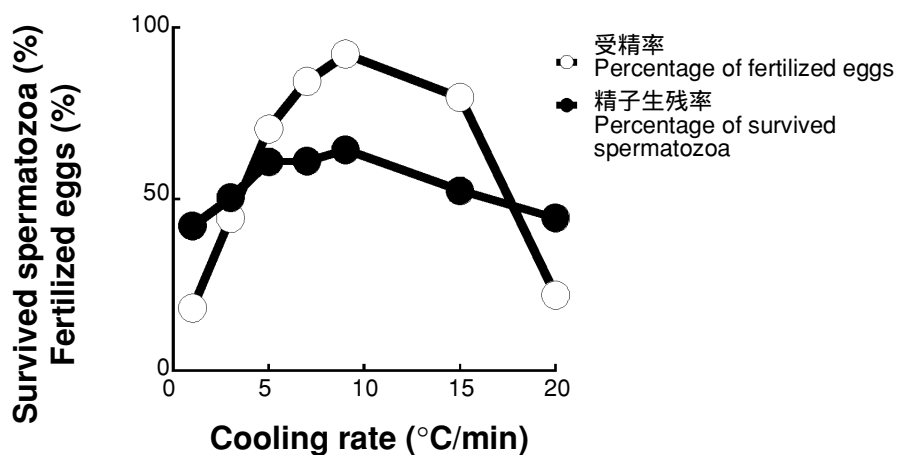


図 3 各冷却速度で - 70 まで冷却した精液の精子生残率と新鮮な卵に媒精した時の受精率

Fig. 3 *Percentage of survived spermatozoa which were cooled to - 70 at different cooling rates, and percentage of fertilized eggs after insemination with the sperm.

[凍結精液と新鮮精液]

凍結精液と新鮮精液の受精能力について比較した。その結果、新鮮精液では卵 1 に対して精子が 50 あれば十分な受精率が得られたが、凍結精子では 6 倍の 300 が必要とされた (図 4)。

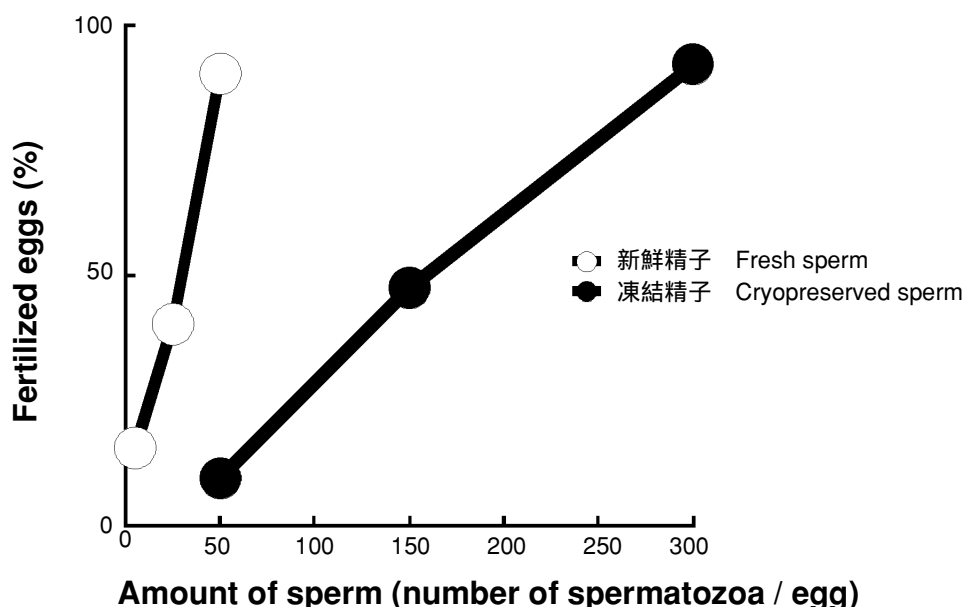


図 4 凍結精液と新鮮精液の受精能力の比較

Fig. 4 Comparison of fertility between fresh and cryopreserved sperm.

[アコヤガイ精子の形態観察]

アコヤガイの新鮮精子と凍結精子の形態を走査型電子顕微鏡で観察した。形態の異常は A) 先体の奇形：先体が受精を終了した先体反応後のように離脱し、芯を形成している精子。B) 頸部の奇形：頸部が曲がっている精子。C) 頭部の奇形：頭部が膨化している精子。D) 鞭毛の脱落：鞭毛が脱落している精子。の 4 つに分類する事ができた (図 5)。

奇形の出現は凍結条件によって差が見られた。先体の奇形は DMSO 濃度が 1%、冷却速度が 1 /min と遅いときに多く見られた。頭部の奇形と鞭毛の脱落は DMSO 濃度が 1%、冷却速度が 20 /min と早いときに多く見られた。頸部の奇形は新鮮精液でも凍結精液でも多くみられた。

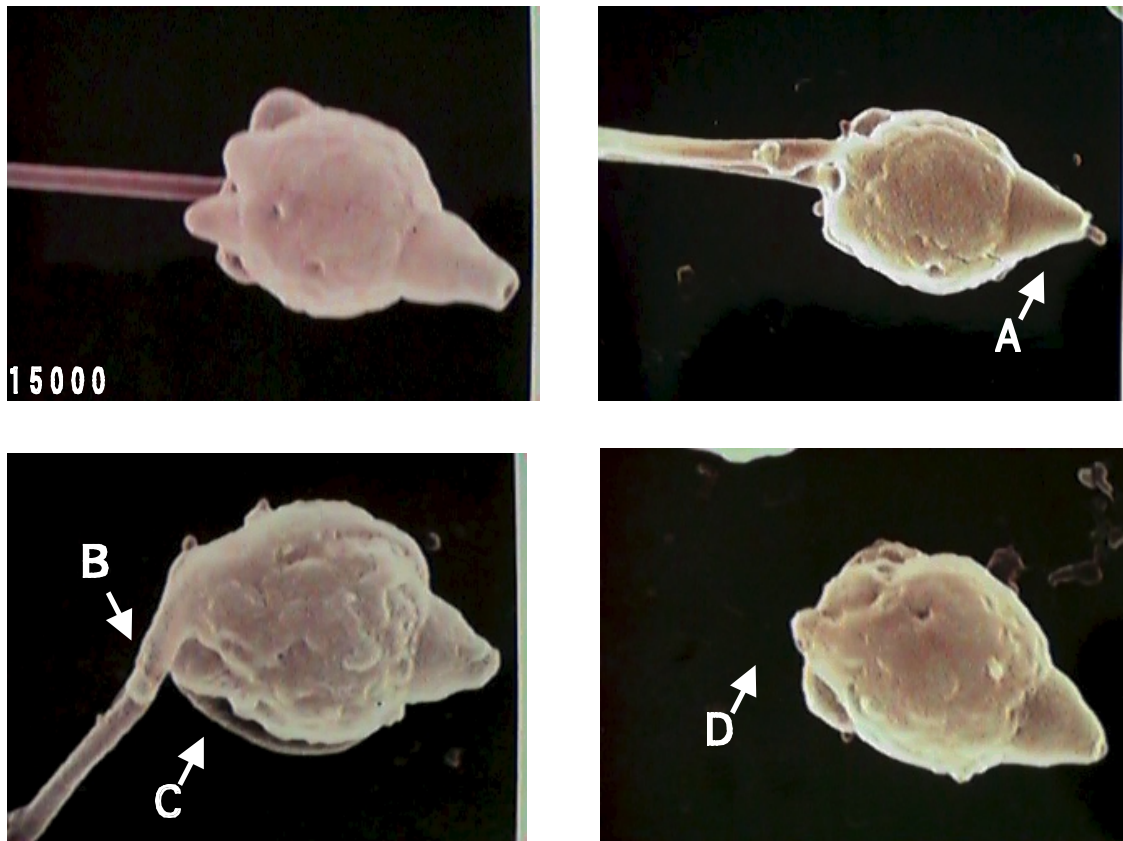


図5 精子の形態観察

10. 考察

一般に、細胞の凍結保存には凍害防御剤が添加される。本研究では凍害防御剤に 10% DMSO を用いたが、DMSO の毒性を考慮し、さらに効果的な凍害防御剤の種類や濃度、組み合わせを検討する必要がある。本研究では、予備凍結法としてプログラムフリーザー saan - CM21 を用いて毎分 9 の冷却速度で最も高い精子の生残率と受精率が得られたが、植氷操作は行われなかった。一般に精液の凍結には植氷操作を必要とされていないが、さらに精子の生残率と受精率の向上を望むならば氷結晶の成長を止める必要がある。本研究で凍結した精液を液体窒素中で約 35 日間保存したが、生残率及び受精率の低下は全く認められなかった。これにより長期保存の可能性が示唆されたが、今後定期的に精子の生残率と受精率の調査が必要である。一方、アコヤガイの新鮮精液と凍結精液を受精能力で比較すると凍結精液の受精能力は新鮮精液の 1/6 程度であった。産業的には、これら凍結精液の量を増やすことで、受精能力の低さを補うことが可能であるが、今後、受精受精能力が向上するための条件についてさらに検討を進めていく必要がある。超低温 (-196) における保存は、現状では最も優れた保存法であるが、いくつかの問題点も指摘されている。そのひとつとして凍結による遺伝形質の変化の可能性があり、今後の解明が望まれる。本研究では、プログラムフリーザーを用いて、予備凍結法で冷却したが、近年、vitrification 法による動植物の細胞・組織の

超低温保存が飛躍的に増加している。アコヤガイ精液の凍結保存においても、このように高価なプログラムフリーザーを必要としない、簡便な凍結保存技術を検討する必要がある。

11. 今後の展開

本研究によりアコヤガイの凍結精子による種苗生産が可能になった。一方、卵及び胚の凍結保存法はいまだ確立されていない。雌雄両方の遺伝子の保存が可能となれば、真珠産業上の重要な品種の保存にとどまらず、海洋汚染等により絶滅しつつある天然貝や、近年めざましい進歩を遂げたバイオ技術によって作出された有用品種の長期保存法として大きく期待される。また、産業に応用することで、品種改良等が飛躍的に進展し、高品質真珠の安定生産に大きく貢献できるものと考えられる。今後は卵及び胚の凍結保存条件を検討し、凍結保存法を開発したい。

12. 参考文献

- 1) 岩田仲弘・黒倉 寿・平野礼次郎 (1989) : マガキ精液の凍結保存 . 水産増殖 , 37(3) , 163–166 .
- 2) 黒倉 寿・八木信行・平野礼次郎 (1989) : ウニ精液の凍結保存に関する研究 . 水産増殖 , 37(3) , 215–219 .
- 3) 松永浩昌・岩田仲弘・黒倉 寿・平野礼次郎 (1983) : アワビ属精液の凍結保存に関する研究 - 予報 . 広大生物生産学部紀要 , 22(1) , 135–139 .
- 4) H. Kurokura, K. Namba, and T. Ishikawa (1990) : Lesions of Spermatozoa by Cryopreservation in oyster *Crassostrea gigas*. Nippon Suisan Gakkaishi, 56(11), 1803–1806
- 5) 宮木廉夫・道津喜衛 (1987) : 走査型電子顕微鏡によるフグ科魚類の凍結保存精子の形態 . 長崎大学水産学部研究報告 , 第 62 号
- 6) 黒倉 寿・富田政勝・岩橋正雄・宮尾 誠・岩田仲弘・平野礼次郎 (1964) : ニシキゴイ精液の長期保存 . 水産増殖 , 32(3) , 148–152 .
- 7) K. Miyaki, K. Yoshikoshi, and O. Tabeta (1993) : Scanning Electron Microscopic Observation on Cryopreserved Spermatozoa in Six Species of Pufferfishes. Nippon Suisan Gakkaishi, 59(5), 891
- 8) J. C. Gwo, H. Kurokawa, and R. Hirano (1993) : Cryopreservation of Spermatozoa from Rainbow Trout, Common Carp, and Marine Puffer. Nippon Suisan Gakkaishi, 59(5), 777–782
- 9) M. Doi, T. Hoshino, Y. Taki, and Y. Ogasawara (1982) : Activity of the Sperm of the Bluefin Tuna *Thunnus thynnus* under Fresh and Preserved Conditions. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 48(4), 495–498

13. 研究業績

13-1. 原著論文 なし

13-2. 総説など なし

13-3. 国際学会発表 なし

13-4. 国内学会発表 なし

13-5. 新聞など なし

13-6. 特許申請

[発明の名称] 真珠貝類の人工種苗生産法

平成 8 年 (1996) 11 月 26 日 特願平 8-329035

平成 10 年 (1996) 6 月 9 日 特開平 10-150879

14.

(1)

(2)

(3)

(4)

(5)

(6) Abstract

In the field of livestock breeding, low temperature storage of bovine semen has been widely practiced for some time. Now in the field of marine biology, frozen semen storage technology is rapidly developing with attempts at application in salmon and trout reproduction. In marine invertebrates this technology has been limited to a few species such as sea urchin, oyster and abalone while no application has been made in frozen semen storage in the pearl oyster. Because of the importance of this species for the production of high quality Japanese pearls, it is hoped that new technology will provide a means for its preservation and cultivation. Thus in the present study we have examined the conditions for frozen semen storage in the pearl oyster and attempted reproduction using frozen semen for fertilization. As a result we succeeded in reproduction of 800,000 oysters using semen stored at -196°C in liquid nitrogen for 35 days.