アコヤガイ精子の大量凍結保存方法の検討

青木 秀夫,^{1*} 古丸 明,² 成田 光好,² 磯 和 潔,³
林 政博,¹ 川元 貴由,⁴ 津田 悠也,⁴ 太田 博巳⁴

(2006 年 10 月 30 日受付, 2007 年 6 月 12 日受理)

¹三重県科学技術振興センター水産研究部, ²三重大学大学院生物資源学研究科,

³三重県栽培漁業センター, ⁴近畿大学大学院農学研究科

Large-scale cryopreservation of Japanese pearl oyster *Pinctada fucata martensii* sperm

HIDEO AOKI,^{1*} AKIRA KOMARU,² TERUYOSHI NARITA,² KIYOSHI ISOWA,³
MASAHIRO HAYASHI,¹ TAKAYUKI KAWAMOTO,⁴ YUYA TSUDA⁴ AND HIROMI OHTA⁴

¹Fisheries Research Division, Mie Prefectural Science and Technology Promotion Center, Shima, Mie 517-0404, ²Graduate School, Faculty of Bioresources, Mie University, Tsu, Mie 514-8507, ³Mie Prefectural Fish Farming Center, Shima, Mie 517-0404, ⁴Department of Fisheries, Graduate School of Agriculture, Kinki University, Nara 631-8505, Japan

To develop methods for large-scale cryopreservation of Japanese pearl oyster spermatozoa, post-thaw motility and fertility of spermatozoa cryopreserved in straw and in a flat-bottomed aluminum cup were compared. Spermatozoa diluted 1:19 with an extender comprising 10% methanol, 72% seawater, and 18% fetal bovine serum were placed in the straw (0.25, 1.0, and 2.0 mL) and in the cup (10 mL). The vessels were then cooled in LN vapor to -50°C at a cooling rate of -17.6 to $-20.6^{\circ}\text{C}/\text{min}$, and immersed in LN. The percentages of motility of spermatozoa cryopreserved in 0.25 mL, 1.0 mL, 2 mL straws, and the cup were 35.2%, 31.1%, 23.2%, and 31.8%, respectively, of the pre-cryopreserved spermatozoa. When 100 μL of semen (pre-cryopreserved or cryopreserved in the 3 kinds of straw) was introduced to 2.5 million eggs, the percentages of fertility were invariably high, but not significantly different from one another. When fresh spermatozoa with low motility were cryopreserved, thawed, and then introduced to eggs, the percentage of fertility increased in a time-dependent fashion, until 20 min after the commencement of insemination. There were no harmful effects on growth and feed intake ability of pearl oyster larvae when the contact time of gametes at fertilization had been prolonged from 5 min to 60 min.

キーワード：アコヤガイ, 種苗生産, 精子, 大量凍結保存

アコヤガイ *Pinctada fucata martensii* はわが国の真珠養殖における母貝として使用されており, 重要な養殖対象種に位置づけられている。しかし, 近年, 赤変病や有害なプランクトンによるアコヤガイのへい死の発生が問題となっており,¹⁻⁴⁾ 真珠の生産量や生産額は低迷している。真珠の生産性の向上および高品質化を図るためには, 育種技術を用いて優良な遺伝的形質を有するアコヤガイを作出することが重要である。^{5,6)} これまでの研究において, アコヤガイの耐病性(高生残)や真珠の品質に関する選抜効果が明らかにされており, 優良家系が開発

されている。⁷⁻¹⁰⁾ 現在, 種苗生産施設において作出された優良家系は, 継代飼育することにより維持されている。¹¹⁾ 継代飼育には特殊な技術を必要としない一方, 飼育に伴う作業の負担や, 飼育中における疾病や自然災害等の発生により家系の維持が困難になるという危険がともなう。

筆者らは, アコヤガイの育種技術の高度化および効率化を図るとともに, 上述した継代飼育に伴う課題に対応するための対策の一つとして, 精子の凍結保存技術の開発に取り組んでいる。これまでに保存容器として家畜精

子の凍結保存用に市販されている容量 0.25 mL の小型ストローを用い、最適な凍結保存条件を明らかにした。¹²⁾しかし、凍結保存した精子を事業規模での種苗生産に活用するためには、より大型の保存容器を利用した効率的な保存方法の開発が望まれる。¹³⁻¹⁶⁾

アコヤガイの種苗生産では、親貝として雌雄の貝を 1 個体ずつ、あるいは同数程度の複数個体同士で人工授精が行われる。¹⁷⁻²⁰⁾したがって、実用的な精子の凍結保存技術の到達目標は、雌 1 個体の卵 (1,000~2,000 万粒) に対して受精が可能な量の精液を一つのロットとして凍結保存することである。

そこで本研究では、まずこれまでに開発した 0.25 mL のストローによる凍結保存方法の改良を行うため、ストロー容量の大型化 (1 mL および 2 mL) がアコヤガイ精子の凍結・解凍後の運動活性および受精率に及ぼす影響を調べた。次に、さらに大型の容器での凍結保存方法の開発を目的として、アルミニウム製容器 (以下、アルミカップ) を用いて 10 mL の希釈精液を板状に凍結保存した時の精子の運動活性と受精能力を調べ、その実用性について検討した。さらに、この 10 mL 容量で凍結保存した精子を用いて人工授精を行う際の媒精方法についても検討を加えた。

材料と方法

親貝からの採精, 採卵 試験貝には、三重県栽培漁業センター (三重県志摩市) において林, 瀬古¹⁸⁾の方法により人工生産され、三重県英虞湾内の漁場で育成されたアコヤガイ 3 年貝を用いた。試験貝の人工生産に用いた親貝は、雌雄の個体とも日本産アコヤガイであった。

成熟した雄個体から摘出した生殖巣をメスで切開し、滲出した精巣精液をピペットを用いて 1.5 mL マイクロチューブに集め、実験使用時まで氷冷保存した。精巣精液は 2 mM アンモニア添加海水で希釈 30 秒後の運動率²¹⁾を顕微鏡下で観察し、比較的運動率の高いものだけを選び、実験に用いた。

雌個体からの採卵は、雄個体と同様に切開法で行った。雌個体から卵を採取し、0.75 mM アンモニア添加海水を入れたビーカーに収容して成熟を促進させた。²²⁾光学顕微鏡によりほとんどの卵で卵核胞が消失していることを確認した後に、受精実験に供した。

精子の凍結保存 Kawamoto *et al.*¹²⁾の方法に準じ、精子の凍結保存を行った。すなわち、精巣精液をアコヤガイ精子の凍結用保存液 [メタノール 10% + ウシ胎児血清 (fetal bovine serum; FBS, Sigma-Aldrich Co.) 18% + 海水 72% (全て V/V%)] で 20 倍に希釈した。この希釈精液を保存容器 (ストローまたはアルミカップ) に収容した後、ストローをデュワー瓶 (サーモカット D-6000; サーモス株式会社; 内径 185 mm, 高さ 300

mm), アルミカップは発泡スチロール箱 (縦 195 mm, 横 265 mm, 高さ 205 mm) を冷却容器として用いた。デュワー瓶あるいは発泡スチロール箱に液体窒素を深さ 5 cm 程度入れ、蓋をした気相中で保存容器を冷却した。冷却速度は液体窒素の液面上から希釈精液を入れた容器までの高さを変えることにより -10~-20°C/分となるように調整した。サンプル温度が低下し、-50°C に達した時点で容器を液体窒素中に浸漬して凍結を完了した。冷却中の希釈精液の温度は、ストロー容器の場合には、熱電対 (ET-1, 株式会社チノー) を挿入した同型の容器を試験サンプルと並置し、またアルミカップ容器の場合には熱電対のセンサー部を希釈精液の中央部位に固定し、いずれも熱電対を温度記録計 (AL3000, 株式会社チノー) に接続してモニタリングした。冷却速度はサンプルが 0°C から -40°C まで冷却されるのに要した時間を計測し、その分速で示した。²³⁾

精子の液体窒素内での保存時間は、1 時間以上とした。

精子の運動活性 採精した精液、あるいは解凍した凍結精子溶液を 1 μ L 採取し、2 mM アンモニア添加海水で精巣精液の最終希釈比が 1000 倍となるように希釈し、試験管ミキサーで軽く攪拌した。その一部 (8 μ L) をホールスライドグラス (Teflon printed glass slide; フナコシ株式会社) に滴下して、精子の運動性を光学顕微鏡に接続したビデオテープレコーダーで録画した。画像をコマ送り再生して、アンモニア添加海水で希釈 30 $\pm$ 1 秒後の画像から無作為に抽出した 50 個以上の精子のうち、前進運動しているものの比率 (運動精子比) を測定した。1 個体について同様に 2 回繰り返して運動精子比を測定し、平均値をその個体の運動精子比とした。

受精率の測定 媒精後、ビーカーからおよそ 10 万粒の卵を採取してろ過海水で洗浄し、500 mL ビーカーへ収容して 25°C に設定したウォーターバス内に静置した。媒精後 2 時間以上が経過した卵 (4 細胞期以降) を検鏡して受精率を測定した。光学顕微鏡下で無作為に 50 個以上の卵を抽出し、そのうち正常に分裂 (卵割) している卵の割合を受精率とした。各媒精処理について同様に 3 回繰り返して受精率を算出し、平均値をその個体の受精率とした。

大型ストロー容器の検討 大容量のストローを用いた精子の凍結保存方法の有効性について検討した。試験は 2005 年 6 月に三重県栽培漁業センターで実施した。試験貝にはアコヤガイを雌雄 4 個体 (平均湿重量 65.3 g) ずつ用い、受精実験は雌雄一対の組合せで 4 回実施した。

実験に用いたストローを Fig. 1 に示した。使用したストローは、容量が 0.25 mL (ストロー精液管極細型; 富士平工業株式会社; 内径 1.8 mm), 1 mL (ストロー精液管太型; 富士平工業株式会社; 内径 4.0 mm), 2

Fig. 1 Three kinds of straw (0.25, 1, and 2 mL) used in the experiment.

mL（ストレートストロー；大和物産株式会社；内径 4.2 mm，長さを 13.5 cm に切断して使用）の 3 種類とした。

雄 1 個体から精巣精液を 400 μ L 採取し，そのうち 300 μ L を保存液で 20 倍に希釈し，0.25 mL ストロー 8 本，1 mL ストロー 2 本，2 mL ストロー 1 本に分注した後，それぞれストローパウダー（富士平工業株式会社）で封入した。ストローはステンレスデュワー瓶中の液体窒素の液面上に浮かべた発泡スチロール製のフロートに配置して冷却した。0.25 mL ストローでは液体窒素液面から 10 cm の高さにストローを固定し，その時の冷却速度は $-18.9 \pm 1.2^\circ\text{C}/\text{分}$ ，1 mL ストローでは 5 cm の高さで $-17.6 \pm 0.3^\circ\text{C}/\text{分}$ ，2 mL ストローでは 2 cm の高さで $-20.6 \pm 0.5^\circ\text{C}/\text{分}$ であった（いずれも $n=4$ ）。

解凍は 20°C の淡水中にストローを浸漬する方法で行い，0.25 mL ストローでは 15 秒間，1 mL ストローでは 50 秒間，そして 2 mL ストローでは 80 秒間浸漬することにより，ストロー内温度をおよそ 15°C まで上昇させた。これらを直ちに淡水から取り上げて開封し，精子活性の測定と人工授精に供した。

残りの精液 100 μ L は，新鮮精子として使用し，媒精量を揃えるために人工授精する直前にろ過海水で 20 倍に希釈して用いた。

雌 1 個体から卵 1,000 万粒を採取し，250 万粒ずつ 4 ロットに分割して，それぞれ 500 mL ガラスビーカーに移し，0.75 mM アンモニア添加海水を加えて 248 mL とした。各ビーカーに解凍した凍結精子溶液，あるいは海水で 20 倍希釈した新鮮精子溶液を各 2 mL（その内精液量は 100 μ L）添加し，攪拌しながら 5 分間の媒精時間を置き，卵をろ過海水で洗浄した後に受精率を測定した。

大量凍結用アルミカップ容器の検討 成熟した雌 1 個体分に当たる 1,000 万粒の卵を一度に媒精できる精子

Fig. 2 The aluminum cup (54 mm bottom diameter) containing 10 mL of diluted semen.

量の凍結保存方法について検討した。試験は 2006 年 5 月に三重県栽培漁業センターで実施した。試験具にはアコヤガイを雌雄 4 個体（平均湿重量 66.2 g）ずつ用い，受精実験は雌雄一対の組合せで 4 回実施した。凍結保存容器にはアルミカップ（持ち手つきアルミカップ No. 3；アズワン株式会社；上部直径 60 mm，下部直径 54 mm，深さ 16 mm，容量 40 mL）を用いた。

雄 1 個体から精液を 550 μ L 採取し，そのうち 500 μ L を凍結保存用として保存液で 20 倍希釈して 10 mL とし，アルミカップに収容した。10 mL の希釈精液を入れたアルミカップを Fig. 2 に示した。発泡スチロール製容器に液体窒素を入れ，容器中に設置したステンレス製の架台上にアルミカップを置いて冷却した。アルミカップ底面と液体窒素液面との距離はおおよそ 3 mm に維持し，その時の冷却速度は $-19.0 \pm 2.1^\circ\text{C}/\text{分}$ であった。 -50°C に達した時点でアルミカップを直ちに液体窒素に浸漬し，凍結を完了した。

解凍は，アルミカップを液体窒素中から取り上げ，直ちに 20°C の淡水中に容器の底面と側面を浸漬させ，精液が淡水に接しないよう注意を払った。浸漬時間は目視で希釈精液が融解するのが確認できるまでとしたが，それに要した時間はおよそ 60～80 秒であった。解凍した精子溶液は，精子活性の測定と人工授精に供した。精巣から採取した残りの精液 50 μ L については，新鮮精子として使用した。

雌 1 個体から卵 1,100 万粒を採取し，そのうち凍結精子の受精用として 1,000 万粒を 2 L ガラスビーカーに移し，0.75 mM アンモニア添加海水を加えて 990 mL とした。ほとんどの卵の卵核胞が消失した時点で凍結精子溶液 10 mL（精液量は 500 μ L）を添加して最終液量を 1,000 mL とした。また新鮮精子区として残りの卵 100 万粒を同海水 100 mL に収容し，新鮮精子（原精液）50

μL を添加した。ビーカー内の海水を攪拌し、媒精時間はストロー容器での受精実験と同じ5分間に設定した。卵をろ過海水で洗浄後、受精率を測定した。

アルミカップ凍結精子の媒精時間の検討 前項のアルミカップを用いた凍結保存精子を媒精する際の適切な媒精時間について検討した。試験は2006年6月に三重県栽培漁業センターで実施した。試験具には雌雄のアコヤガイ各5個体(平均湿重量68.1 g)を用い、受精実験は雌雄一対の組合せで5回実施した。前項と同様の方法で精子の凍結および解凍を行い、卵に媒精後、凍結精子、新鮮精子とも媒精開始から5, 10, 20, 30, 45, 60分が経過した時点で、ビーカーから精子と卵を含む媒精溶液を10 mLずつ取り出し、一部は顕微鏡で精子の運動状態を録画し、残りは直ちにろ過海水を用いて卵を洗浄した後、受精率を測定した。

媒精時間を変えて受精させた卵から発生した幼生の飼育 媒精時間を長くして人工授精した時の幼生の成長、形態および摂餌能力を調べ、媒精時間の長期化が幼生の健全性に及ぼす影響について検討した。試験は2006年6月に三重県栽培漁業センターで実施した。雌雄のアコヤガイ親貝各4個体(平均湿重量64.4 g)を用い、交配は雌雄一対の組合せで4回実施した。

雌1個体から卵500万粒を採取して2 L ガラスビーカーに移し、0.75 mM アンモニア添加海水を加えて500 mLとした。雄1個体から得た精液250 μL を添加し、5分後および60分後に媒精溶液を10 mLずつ採取して、ろ過海水で卵を洗浄した後、受精率を測定した。また同時間に媒精溶液を100 mLずつ採取して、卵をろ過海水で洗浄した後に30 L水槽(ろ過海水量25 L)に移し、この水槽を25°Cに設定したウォーターバス内に設置した。媒精して24時間後に浮上したベリジャー幼生をネットで収集して、別の30 L水槽に収容して飼育を開始した。開始時における幼生の飼育密度は、媒精5分区分では 8.5 ± 0.8 個体/mL、60分区分では 6.1 ± 2.0 個体/mLであった。飼育期間は幼生の浮遊期間である19日間とした。飼育水にはろ過海水を使用し、水温は25°Cとして止水状態で飼育した。餌料にはハプト藻綱の植物プランクトンである *Pavlova lutheri* を用い、1日1回午前中に給餌した。幼生の摂餌量は、前日に給餌した量から当日の残餌量を差し引いて推定した。飼育水中の *P. lutheri* の数(残餌量)は、粒度分布測定機(マルチサイザーⅢ, ベックマン・コールター株式会社)によって測定した。

飼育開始1, 10, 19日目に各区から幼生を30個体ずつ無作為に採取し、万能投影機(V-12A, 日本光学工業株式会社)を用いて殻長と殻高を測定した。また、幼生の形態的特徴を示す指標として、[殻長比=殻長/(殻長+殻高)]を算出した。

統計学的処理 全ての測定値は平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。運動精子比、受精率および幼生の飼育成績については、測定値を逆正弦変換した後、2処理区の場合は対応のある *t* 検定により、3処理区以上の比較の場合は1元配置分散分析とTukeyのHSD検定(多重比較)により、処理区間に有意な差があるかどうか検定した。有意水準は5%とした。

結 果

大型ストロー容器の検討 新鮮精子並びに3種のストロー容器を用いて凍結、解凍した精子の運動精子比と、この精子溶液2 mL分(含まれる精液量は100 μL)を250万粒に媒精した時の受精率をFig. 3に示した。新鮮精子の運動精子比は $73.0 \pm 1.8\%$ であった。一方、凍結・解凍後の運動精子比は、0.25 mLストローでは $25.7 \pm 2.1\%$ (新鮮精子に対する相対比は35.2%)、1 mLストローでは $22.7 \pm 3.1\%$ (同、31.1%)、2 mLストローでは $17.0 \pm 1.3\%$ (同、23.2%)であった。3種のストローを比較すると、2 mLストローの運動精子比は、他の2種に比べ有意に低い値であった。受精率は、新鮮精子では $62.3 \pm 2.4\%$ 、0.25 mLストローでは $58.9 \pm 2.1\%$ (新鮮精子に対する相対比94.5%)、1 mLストローでは $56.3 \pm 8.9\%$ (同、90.3%)、2 mLストローでは $59.9 \pm 5.6\%$ (同、96.1%)を示し、全ての実験区間で有意な差は認められなかった。

アルミカップ容器の検討 アルミカップを用いて凍結、解凍した精子の運動精子比、および解凍した精子溶液10 mL(含まれる精液量は500 μL)を1,000万粒に媒精した時(媒精時間は5分)の受精率をFig. 4に示した。本実験で用いた新鮮精子の運動精子比は全般に低く、運動活性が比較的高い個体を選んだものの、運動精

Fig. 3 Post-thaw motility and fertility of spermatozoa cryopreserved in 3 kinds of straw. Testicular semen (100 μL) diluted 1:19 with extender was cryopreserved, thawed, and diluted with seawater containing 2.0 mM NH_3 or introduced to 2.5 million eggs. The results represent means $\pm$ SEM ($n=4$). Values marked with different letters differ significantly (Tukey's HSD test, $p < 0.05$).

Fig. 4 Post-thaw motility and fertility of spermatozoa cryopreserved in an aluminum cup. Testicular semen (500 μ L) diluted 1:19 with extender was cryopreserved, thawed, and diluted with seawater containing 2.0 mM NH_3 or introduced to 10 million eggs. The results represent means $\pm$ SEM ($n=5$). Values marked with different letters differ significantly (Paired t test, $p<0.05$).

Fig. 5 Time-dependent changes, after the commencement of insemination, in percent motility of spermatozoa cryopreserved in an aluminum cup, thawed, and diluted with seawater containing 0.75 mM NH_3 containing eggs. The results represent means $\pm$ SEM ($n=5$). Values marked with different letters differ significantly (Tukey's HSD test, $p<0.05$).

子比は $46.7 \pm 8.0\%$ であった。一方、凍結保存し、解凍した後の運動精子比は $13.0 \pm 1.9\%$ (相対比 27.8%) であった。また受精率は、新鮮精子 (50 μ L 精液を 100 万粒に媒精) では $71.4 \pm 5.4\%$ 、凍結精子では $8.8 \pm 2.1\%$ (相対比 12.3%) で、両者の間に有意な差が認められた。

アルミカップ凍結保存精子の媒精時間の検討 アルミカップを用いて凍結保存した精子を用いて同様に媒精し、洗卵するまでの時間を 5 分から 60 分まで変えた場合の、それぞれの時間における運動精子比を Fig. 5 に、受精率を Fig. 6 に示した。本実験で用いた新鮮精

Fig. 6 Time-dependent changes, after the commencement of insemination, in percent fertility of eggs inseminated with spermatozoa cryopreserved in an aluminum cup. The results represent means $\pm$ SEM ($n=5$). Values marked with different letters differ significantly (Tukey's HSD test, $p<0.05$). The asterisks indicate significant difference between fresh and cryopreserved groups (Paired t test, $p<0.05$).

子の運動精子比は $42.4 \pm 5.0\%$ で前項と同様に低く、凍結精子の解凍後の運動精子比は $13.5 \pm 1.9\%$ (相対比 31.8%) であった。媒精後の運動精子比は、新鮮精子では 5 分後が $40.9 \pm 4.8\%$ と最も高く、その後次第に低下して 60 分後には $17.4 \pm 2.1\%$ となり、5 分後に比べて有意な差が認められた。一方、凍結精子では 5 分後に $10.7 \pm 1.5\%$ を示し、媒精時間の経過に伴う運動精子比の低下はみられず、媒精 10 分後から 60 分後まではほぼ一定の値で推移し、各時点での測定値の間に有意な差は認められなかった。新鮮精子と凍結精子の運動精子比を比較すると、各時点とも凍結精子の方が新鮮精子に比べて有意に低かった。

受精率は、新鮮精子では媒精 5 分後において既に $51.0 \pm 2.6\%$ を示し、その後時間経過とともに徐々に上昇し、20 分後には $65.7 \pm 5.4\%$ となり、5 分後に比べて有意に高くなっていった。20 分以後 60 分後まではほぼ一定の受精率を示した。一方、凍結精子では 5 分後の受精率は $13.9 \pm 4.6\%$ と低い値を示したが、媒精時間の増加とともに急激な上昇を示し、20 分後では $53.8 \pm 5.6\%$ と 5 分後に比べて有意な差が認められた。その後 60 分後までは有意な変化は認められなかった。新鮮精子と凍結精子の受精率を比較すると、媒精時間が 5 分では両者に有意な差が認められたが、10 分以上では有意差は認められなくなった。

媒精時間を変えて受精させた卵から発生した幼生の飼育 媒精時間を 5 分間および 60 分間とした場合の受精率は、媒精 5 分区では $55.9 \pm 1.9\%$ 、媒精 60 分区では $67.8 \pm 3.0\%$ で、媒精 60 分区の方が有意に高かった。

飼育開始 1, 10, 19 日目における幼生の殻長を Fig. 7

Fig. 7 Comparison of growth of Japanese pearl oyster larvae produced by different contact time of gametes at insemination (5 and 60 min). The results represent means $\pm$ SEM (n=4).

Fig. 8 Comparison of shell length/(shell length+shell height) as a morphological characteristic of Japanese pearl oyster larvae produced by different contact time of gametes at insemination (5 and 60 min). The results represent means $\pm$ SEM (n=4). SL: Shell length, SH: Shell height.

に示した。飼育期間中において、媒精5分区分および60分区分とも幼生に成長停滞等の異常はみられなかった。開始1日目（媒精24時間後）の幼生の殻長は、媒精5分区分では $76.3 \pm 1.1 \mu\text{m}$ 、媒精60分区分では $74.1 \pm 1.4 \mu\text{m}$ であった。その後、両区の幼生は順調に成長し、19日目（飼育終了日）の値は、媒精5分区分では $232.5 \pm 6.6 \mu\text{m}$ 、媒精60分区分では $233.7 \pm 5.1 \mu\text{m}$ であった。幼生の殻長比を Fig. 8 に示した。1日目の幼生の殻長比は、媒精5分区分では $52.9 \pm 0.3\%$ 、媒精60分区分では $52.7 \pm 0.1\%$ であった。その後、殻長比は両区とも低下し、19日目の値は、媒精5分区分では $51.9 \pm 0.2\%$ 、媒精60分区分では $52.0 \pm 0.1\%$ であった。各測定日において、幼生の殻長および殻長比には両区間に有意差は認められなかった。

飼育期間中における6日毎の幼生の摂餌細胞数を Fig. 9 に示した。開始1日目から6日目までの摂餌細胞数は、媒精5分区分では $602 \pm 45 \text{ cells/個体/日}$ 、媒精60

Fig. 9 Comparison of feed intake of Japanese pearl oyster larvae produced by different contact time of gametes at insemination (5 and 60 min). The results represent means $\pm$ SEM (n=4).

分区分では $716 \pm 31 \text{ cells/個体/日}$ であった。7日目から12日目までの値は、媒精5分区分では $2,963 \pm 243 \text{ cells/個体/日}$ 、媒精60分区分では $2,860 \pm 192 \text{ cells/個体/日}$ で、13日目から18日目までの値は、媒精5分区分では $8,438 \pm 989 \text{ cells/個体/日}$ 、媒精60分区分では $8,031 \pm 1,084 \text{ cells/個体/日}$ であった。各期間において、摂餌細胞数には両区間に有意差は認められなかった。

なお、飼育期間中において、へい死個体は両区とも確認されなかった。

考 察

アコヤガイ精子の凍結保存技術を事業規模で活用するためには、凍結保存時や人工授精時の作業効率の点から、可能な限り大容量の精子を保存することが望まれる。本研究では、従来用いられてきた0.25 mL ストロー容器を大型化した2種類のストロー容器、並びに従来の保存容器とは異なり薄板状に精子を凍結保存するアルミカップ容器を用いて凍結保存方法を検討した。

細胞をある一定温度まで緩速に冷却し、その後液体窒素温度まで急速冷却する2段階凍結法²⁴⁾では、液体窒素に浸漬する前の到達温度とその到達温度までの冷却速度の違いにより解凍後の細胞の生残率が大きく影響を受けることが知られている。^{25,26)} 本研究では容量の異なる3種類のストローを用いて、到達温度は -50°C 、冷却速度は $-17.6 \sim -20.6^\circ\text{C/分}$ に統一して凍結保存を行った。結果をみると、運動精子比はストロー容量の増加とともにゆるやかに低下する傾向を示した。この原因として、本研究で使用した0.25 mL ストローの内径は1.8 mm であるのに対し2 mL ストローの内径は4.2 mm と大型であるため、容器内の温度変化を測定した中央部と周辺部では冷却条件に差が生じた可能性が考えられること、また到達温度から液体窒素に浸漬する際の冷却速度、および解凍時に液体窒素から 20°C の水にストロー

を浸漬した時の温度上昇速度に差が生じたこと等が考えられる。このような凍結・解凍条件のストロー内の部位による違いが、精子の生存性に大きな影響を及ぼした可能性が高いものと思われる。

一方、3種のストローを用いて凍結保存した精子を媒精したときの受精率についてみると、運動精子比が低下した2 mLストローの場合でも、0.25 mLおよび1 mLストロー、および新鮮精子の値と有意な差は認められなかった。これは、本研究で実施した卵250万粒に対し、20倍希釈精液を2 mL（精巣精液量で100 μ L）という媒精量が凍結解凍後の運動精子比の差（0.25 mLストローでは25.7%、2 mLストローでは17.0%）を反映させないほど、十分な量であったためと思われる。本結果から、アコヤガイの雌1個体分の卵（1,000~2,000万粒）に媒精する精液を2 mLストローを用いて凍結保存する場合には、雄個体から精液を400~800 μ L採取し、保存液で20倍に希釈してストロー4~8本に収容すれば良いものと考えられた。以上のことから、2 mLストローはアコヤガイ種苗生産において精子の大量規模での凍結保存容器として実用的に利用することが可能と判断された。

次にアルミカップ容器を用いた凍結保存の有効性について検討したところ、解凍した凍結精子の運動精子比は凍結前の精子との相対比で27.8%を示し、大型ストローを用いた場合と運動性に遜色は認められなかった。一方、受精率に関してはストロー法で得られた結果とは異なり、凍結精子による受精率は新鮮精子に比べて著しく低い値を示していた。この原因については今のところ明らかではないが、本実験で用いた新鮮精子の運動精子比が46.7%と低かったため、解凍した凍結精子の運動精子比は相対比では27.8%であったものの、実測値では13.0%と低かったことが一因である可能性が考えられた。これらの受精率の結果は、通常のアコヤガイの種苗生産現場での人工授精方法¹⁷⁾である、精子と卵を海水中で混合し、5分間の媒精時間の後に海水で卵を洗浄した場合の結果であった。しかし、アコヤガイの精子はアンモニア海水中で少なくとも2時間以上は運動性を維持することが明らかにされており、²¹⁾媒精時間を長くすることによって、未受精卵と運動精子の接触のチャンスを高め受精率を上昇させるには有効と考えられた。そこで、媒精時間を5分から60分まで延ばしたところ、凍結精子および新鮮精子とも媒精時間が20分以上では受精率の有意な上昇が認められた（Fig. 6）。また媒精時間が10分以上では、凍結精子の受精率は上昇し、新鮮精子との間に有意な差が認められなくなった。これらの結果から、媒精時間を調整することにより、凍結精子の解凍後の運動精子比が著しく低い場合でも、新鮮精子と同等の受精率が得られるものと考えられた。

媒精時間を長くすることにより、受精卵へのアンモニア海水の影響や多精受精の誘起により、幼生の成長、形態および生理的能力に悪影響が懸念される。そこで、媒精時間を5分または60分として受精させてから24時間後における幼生の殻長および形態を示す殻長比を比較したところ、いずれも両区の間には有意差はなかった。このことから、受精からベリジャー幼生への発生において媒精時間を長くすることによる幼生の成長や形態に対する影響はないものと考えられた。その後の幼生の浮遊期間における成長、形態、生残および摂餌能力についても、いずれも両区の間には有意差は認められず、正常に推移した。以上のことから、媒精時間が60分以内であれば、ふ化させたアコヤガイ幼生の成長および生理的能力に支障を来すことはないと考えられた。したがって、アコヤガイ種苗生産において媒精時間を調整することは、運動活性が低い精子を使用する際に受精率を上昇させる対策として有効であると考えられた。なお、本研究では媒精時間の違いによる多精受精の状況は把握していないため、今後この点について解明することが望まれる。

以上述べてきたように、凍結保存容器として容量が2 mLのストローおよびアルミカップを用いることにより、アコヤガイ精子を事業規模で凍結保存できる可能性が示された。今後は、大容量で凍結保存した精子を用いて生産されたアコヤガイの稚貝期以降の飼育成績や貝の生理状態についても調べ、より実的な面から凍結保存技術の有効性を評価することが重要と考えられる。

謝 辞

本研究は、農林水産省の「先端技術を活用した農林水産研究高度化事業」の「アコヤガイ凍結保存法による新養殖システム開発(課題番号1682)」において実施した。

文 献

- 1) 黒川忠英, 鈴木 徹, 岡内正典, 三輪 理, 永井清仁, 中村弘二, 本城凡夫, 中島員洋, 芦田勝朗, 船越将二. 外套膜片移植および同居飼育によるアコヤガイ *Pinctada fucata martensii* の閉殻筋の赤変を伴う疾病の人為的感染. 日水誌 1999; **65**: 241-251.
- 2) 森実庸男, 滝本真一, 西川 智, 松山紀彦, 蝶野一徳, 植村作治郎, 藤田慶之, 山下浩史, 川上秀昌, 小泉喜嗣, 内村祐之, 市川 衛. 愛媛県宇和海における軟体部の赤変を伴うアコヤガイの大量へい死. 魚病研究 2001; **36**: 207-216.
- 3) Matsuyama Y, Uchida T, Honjo T, Shumway SE. Impacts of the harmful dinoflagellate, *Heterocapsa circularisquama*, on shellfish aquaculture in Japan. *J. Shellfish Res.* 2001; **20**: 1269-1272.
- 4) 松山幸彦. 有害渦鞭毛藻 *Heterocapsa circularisquama* に関する生理生態学的研究-II *H. circularisquama* の毒性および貝類死機構の解明. 水研センター研報 2003; **9**: 13-117.
- 5) 和田克彦. アコヤガイ *Pinctada fucata* の改良に関する研

- 究. 養殖研報 1984; **6**: 79-157.
- 6) 和田克彦. 水産無脊椎動物の育種研究の現状と展望. 動物遺伝育種研究 2005; **33**: 27-38.
- 7) Wada KT, Komaru A. Color and weight of pearls produced by grafting the mantle tissue from a selected population for white shell color of the Japanese pearl oyster *Pinctada fucata martensii* (Dunker). *Aquaculture* 1996; **142**: 25-32.
- 8) 林 政博. アコヤガイの殻体真珠層色の改良について. 全真連技術研究会報 1999; **14**: 1-15.
- 9) 林 政博, 青木秀夫. アコヤガイ母貝の選抜育種による真珠の巻きの改良について. 全真連技術研究会報 2001; **15**: 1-7.
- 10) 内村祐之, 西川 智, 浜田耕生, 兵藤勝也, 広瀬琢磨, 石原浩二, 杉本 学, 中島伸佳. 感染症の症状を軽減した耐病性日本産アコヤガイ系統の開発. 水産育種 2005; **34**: 91-97.
- 11) 林 政博, 青木秀夫. 高品質アコヤ貝育成強化事業—Ⅷ. 耐病貝試作品「浜島3号」の飼育結果. 平成17年度三重県科学技術振興センター水産研究部事業報告書, 三重. 2006; 1-2.
- 12) Kawamoto T, Narita T, Isowa K, Aoki H, Hayashi M, Komaru A, Ohta H. Effects of cryopreservation methods on post-thaw motility of spermatozoa from the Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*. *Cryobiology* 2007; **54**: 19-26.
- 13) Wheeler PA, Thorgaard GH. Cryopreservation of rainbow trout semen in large straws. *Aquaculture* 1991; **93**: 95-100.
- 14) Lahnsteiner F, Berger B, Patzner RA. Methanol as cryoprotectant and the suitability of 1.2 ml and 5 ml straws for cryopreservation of semen from salmonid fishes. *Aquacult. Res.* 1997; **28**: 471-474.
- 15) Richardson GF, Miller TL, McNiven MA. Cryopreservation of Arctic charr *Salvelinus alpinus* semen in various extenders and in three sizes of straw. *Aquacult. Res.* 2000; **31**: 307-315.
- 16) Cabrita E, Robles V, Cunado S, Wallace JC, Sarasquete C, Herráez MP. Evaluation of gilthead sea bream, *Sparus aurata*, sperm quality after cryopreservation in 5 ml macrotubules. *Cryobiology* 2005; **50**: 273-284.
- 17) 磯和 潔. アコヤガイ種苗生産. 平成17年度三重県栽培漁業センター事業報告書, 財三重県水産振興事業団, 三重. 2006; 25-31.
- 18) 林 政博, 瀬古慶子. アコヤガイの種苗生産について. 三重水技研報 1986; **1**: 39-68.
- 19) 岩永俊介, 大橋智志, 藤井明彦, 桐山隆哉, 池田義弘. 持続的真珠養殖生産確保緊急対策試験. 平成17年度長崎県総合水産試験場事業報告書, 長崎. 2006; 93-101.
- 20) 内村祐之, 曾根謙一. 愛媛ブランド真珠生産技術開発事業(I 真珠品質向上試験). 平成16年度愛媛県水産試験場事業報告書, 愛媛. 2005; 76-77.
- 21) Ohta H, Kawamoto T, Isowa K, Aoki H, Hayashi M, Narita T, Komaru A. Motility of spermatozoa obtained from testis of the Japanese pearl oyster *Pinctada fucata martensii*. *Fish. Sci.* 2007; **73**: 107-111.
- 22) Wada SK. Studies on the fertilization of Pelecypod gametes—I. Increase in maturity and accomplishment of fertilization of pearl oyster in ammonical sea water. *Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ.* 1963; **12**: 92-108.
- 23) Ohta H, Kawamura K, Unuma T, Takegoshi Y. Cryopreservation of the sperm of the Japanese bitterling. *J. Fish Biol.* 2001; **58**: 670-681.
- 24) Farrant J, Walter C A, Lee H, McGann L E. Use of two-step cooling procedures to examine factors influencing cell survival following freezing and thawing. *Cryobiology* 1977; **14**: 273-286.
- 25) Gwo JC. Cryopreservation of aquatic invertebrate semen: a review. *Aquacult. Res.* 2000; **31**: 259-271.
- 26) 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. 水産育種 2004; **34**: 1-25.