

原著論文

精子運動時間, 精子運動率および体腔液 pH を用いたサケ死卵発生のリスク評価の有効性

宮本幸太^{*1}・高橋史久^{*2}・高橋敏正^{*2}・吉田利昭^{*2}・加賀谷 学^{*2}・
渡邊伸昭^{*2}・片山勇樹^{*2}・北口祐一^{*3}・伴 真俊^{*2}

Effective Assessment of Incidence of Dead Eggs of Chum Salmon (*Oncorhynchus keta*) by Sperm Motility Time, Sperm Motility Rate and Ovarian Fluid pH

Kouta MIYAMOTO, Fumihisa TAKAHASHI, Toshimasa TAKAHASHI,
Toshiaki YOSHIDA, Manabu KAGAYA, Nobuaki WATANABE, Yuki KATAYAMA,
Yuichi KITAGUCHI and Masatoshi BAN

This study investigated the relationships between the eyed-egg ratio and sperm motility time, sperm motility rate and ovarian fluid pH in Chum salmon, to identify biomarkers for risk assessment of dead eggs. During each day of the study, we compared the biomarkers made from 20 salmon which were stocked for propagation to the eyed-egg ratio in hatcheries. Ovarian fluid pH, sperm motility time, and sperm motility rate were related to low eyed-egg ratio during the early period of artificial insemination. Our results suggest that the ovarian fluid pH, sperm motility time and sperm motility rate are meaningful biomarkers for the management of eyed eggs.

2010年8月16日受付、2010年12月11日受理

サケ *Oncorhynchus keta* の人工増殖において、人工授精から放流までの過程で生じる減耗の割合は、生産量の16～19%となっている¹⁾。その中でも発眼卵期までに生じる減耗が約60%を占める²⁾ことから、発眼までの減耗を抑制することで放流までの生残率を高めることが可能になる。発眼までに生じる減耗の要因として、体内死卵と不受精卵の発生が挙げられており、これらは親魚の蓄養^{*4}や人工授精の際の不備が原因とされている³⁾。

そのため、親魚の取り扱いについては、撲殺後の放置時間の上限を設定したり、砕氷を用いて魚体温の上昇を抑制するなどの対処法を講じることで⁴⁾、稚魚の生産率を向上させている⁵⁾。また、人工授精を行う際には、精液の色、卵の感触、未熟卵や血液、胆汁などの混入の有無⁶⁾を基に使用の可否を判別し、不相当と判断された卵や精液は人工授精に用いないようにしている。しかし、このような判別方法は、即座に判断ができるというメリ

*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
〒066-0068 北海道千歳市蘭越9番 Chitose Station, National Salmon Resources Center, FRA, 9, Rankoshi, Chitose, Japan
mkouta@fra.affrc.go.jp

*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 日本海区水産研究所

*4 捕獲した親魚が未成熟な場合、催熟を目的に無給餌の状態で一時的に池に収容する。サケの人工増殖事業現場では、この作業を蓄養と呼ぶ

ットがあるものの、個人の経験に大きく左右されること、技術を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。これらのことから、卵や精液を直接取り扱う人工授精作業の際に、死卵発生リスクを評価できる指標が開発されれば、放流までの減耗抑制が可能になると考えられる。

宮本ら⁷⁾は、顕微鏡下における精子運動時間が、発眼率を予測する際に有効であるとした。しかし、この研究結果は雄親魚1個体に対し雌親魚1個体の組み合わせで人工授精を行い、その受精卵の発眼率と使用した精液および卵の評価指標の測定値との関係を明らかにしたものである。一方、実際の増殖現場では、複数個体の精液や卵を混合して人工授精を行うことが常法であるため⁶⁾、実際の方法と同じ試験が必要であると考えられた。そこで本研究では、精液と卵の評価指標の測定値と、増殖現場で人工授精した卵の発眼率とを比較し、評価指標の測定値が死卵発生リスクを反影できるのかを検討した。

材料と方法

調査場所と標本採集 調査は、社団法人留萌管内さけ・ます増殖事業協会（以下、留萌管内増協とする。）が運営する天塩川捕獲場（図1）において、2008年9月26日、10月2日、10月9日、10月15日および10月22日の5回実施した。なお、9月26日は同捕獲場における人工授精実施期間の初日であった。

供試魚の確保 天塩川捕獲場にて蓄養した親魚群から、雌雄各10個体を調査日ごとに供試した。

精子運動時間の測定 雄親魚の肛門付近の腹部を素手で搾り下げ、排出される精液を冷やしたシャーレの上に採集した。そこから、1 μ l を直ちにスライドグラス上に採り、実際に人工授精で使用している湧水300 μ l を滴下して良く攪拌した後にカバーグラスを載せ、顕微鏡（OLYMPUS社製CX41N-11倍率400）視野下で精子が動いている時間を計測した。精子の運動時間は、水を滴下してから動いている精子が5個以下になるまでの時間とした。

精子運動率の測定 前述の精子運動時間測定時にデジタルビデオカメラ（SONY HDR-SR12）を用いて、顕微鏡下の精子の運動状態を録画撮影した。精子運動率にはLiley *et al.*⁸⁾とMunkittrick and Moccia⁹⁾を参考にして精液の希釈後10秒後に活動している精子の割合を調べ評価した。評価方法は、顕微鏡視野下において全ての精子が活動を静止している状態を0、25%活動している状態を5、50%活動している状態を10、75%活動している状態を15、全ての精子が活発に活動している状態を20とし、5%ごとの20段階で評価を行った。

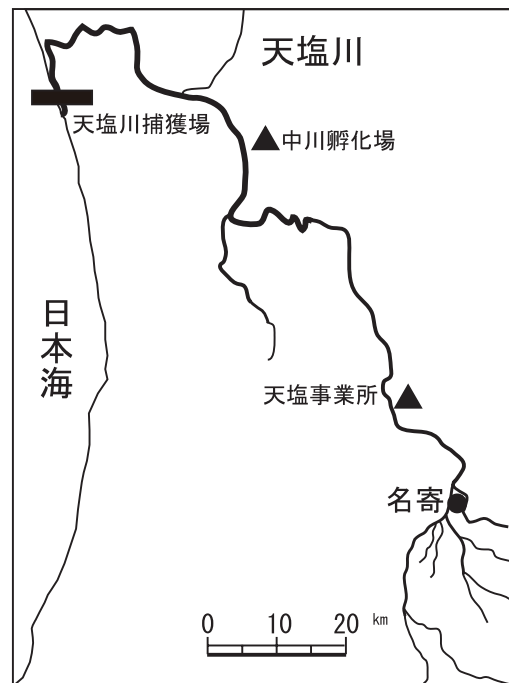
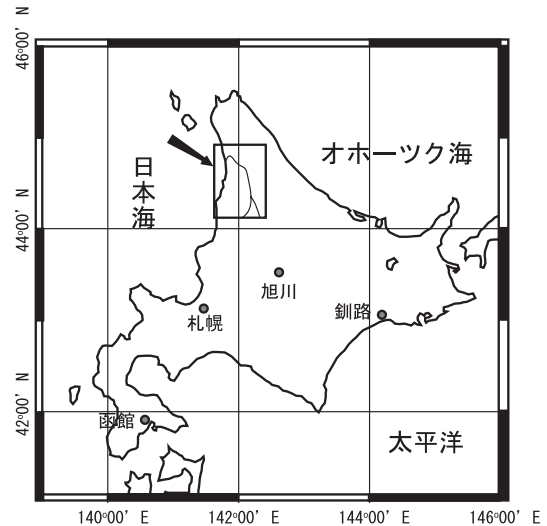


図1. 調査エリア

雌の体腔液 pH の測定 供試魚から採卵する際に体腔液10 ml程度をプラスチック容器に採集し、pH測定器（OAKTON社製pH Spear）を用いて直ちに測定した。

人工授精と卵の輸送 人工授精は受卵盆におおよそ10個体分の卵を入れて、雄親魚3個体以上から圧搾した精液を上からかけ（図2）、十分に攪拌したのちに洗浄・吸水させて行った。吸水約60分後に、輸送用の卵箱へ入れてトラックで社団法人留萌管内さけ・ます増殖事業協会中川孵化場（以下、中川事業所）または独立行政法人水産総合研究センターさけますセンター天塩事業所（以下、天塩事業所、図1）へ輸送し、BOX型ふ化槽に卵を入れて収容した。収容後、積算温度300℃付近にな



図2. 受卵盆に溜めた卵に精液をかけている様子

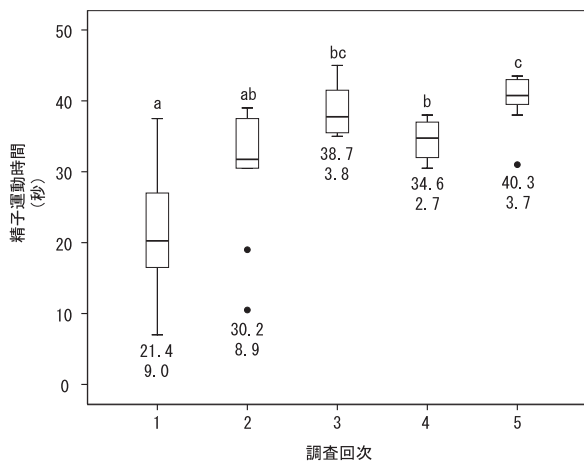


図3. 調査回次ごとの精子運動時間（秒）の比較
箱ひげ図（水平線：中央値，垂線：外れ値を除いた最大・最小値，箱：第一ならび第三四分位数，丸：箱の長さの2倍以上の値である外れ値）
箱ひげ図下の上部の数値：平均値，箱ひげ図下の下部の数値：標準偏差を示す
アルファベットについては有意差を示す

り胚体の両眼点が明らかに認められ，胚体が卵の中で回転するのが確認されたらサイホン式淘汰法⁶⁾を行い，白濁して死んだ卵と発生が進んでいる卵を別々に計数した。

発眼率の算出 調査日ごとに天塩川捕獲場から中川事業所または天塩事業所へ輸送した全ての受精卵を対象に以下の式から発眼率を算出した。

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

以上から，調査当日の発眼率と評価指標の測定値とを比較し，死卵発生リスクの評価技術について検討した。

統計解析 調査日ごとの卵の発眼率の比較には， $k \times 2$ 分割表の比率の χ^2 検定を行い，全体として差が認められる場合，Ryan's 法による対比較を行った。調査日ごとの評価指標の測定値の比較には，Kruskal-Wallis 検定を用い，差が認められる場合には，Steel-Dwass 法による多重比較を行った。なお，全ての検定の有意水準は0.05とした。

結 果

人工授精 卵の発眼率を表1に示す。試験1回次の卵は，発眼に至るまでの過程で目視による生存率が50%以下であることが明らかとなったため，全ての卵を廃棄処分とした。2回次以降の発眼率について対比較を行った結果，最も低い発眼率を示したのは2回次の83.2%であった。4回次に人工授精した卵は95.7%を示し，2回次と3回次に人工授精した卵と比較して有意に高い発眼率を示した。5回次の卵は92.3%の発眼率を示した。

精子運動時間 1回次の測定値は3～5回次と比較して有意に短く，データの四分範囲（データを4等分した際に25%と75%に該当する数値の範囲）も大きくなっていった。2回次に測定した精子運動時間は，3回次と4回次の測定値との間に有意差は認められないものの，中央値は低い値を示した。一方，5回次の測定値は2回次と4回次の測定値と比較して有意に高い値を示した（図3）。

精子運動率 1回次の測定値が有意に最も低い値を示し，2回次の測定値は，3回次，4回次と比較して有意差は認められないものの，最大値と最小値の幅は広く2

表1. 天塩川捕獲場にて人工授精を行った月日，卵の収容場所，収容卵数，発眼卵数および発眼率

調査回次	人工授精月日	収容場所	採卵数 (千粒)	発眼卵数 (千粒)	発眼率 (%) ^{*1}
1	9月26日	天塩事業所	225	—	50以下 ^{*2}
2	10月2日	中川孵化場	1424	1185	83.2 ^a
3	10月9日	天塩事業所	850	760	89.4 ^b
4	10月15日	中川孵化場	578	553	95.7 ^c
5	10月22日	天塩事業所	1300	1200	92.3 ^{bc}

*1 発眼率の右上に付記されているアルファベットは発眼率間の有意差を示す

*2 1回次の発眼率は目視で50%以下であることが認められ，廃棄処分したため発眼卵数は不明とした

回次以降の調査日の中では低い値を示した。5回次の測定値は、精子運動時間と同様に2回次と4回次の測定値と比較して有意に高い値を示していた(図4)。

雌の体腔液のpH 1回次と2回次の測定値は、3～5回次の測定値と比較して有意に低かった。また、2回次以降には測定値の四分位数の幅が小さくなり、高位安定する傾向を示した(図5)。

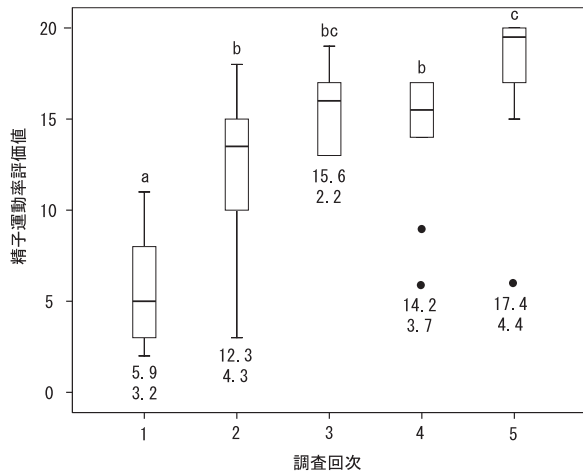


図4. 調査回次ごとの精子運動率評価値の比較
箱ひげ図(水平線:中央値, 垂線:外れ値を除いた最大・最小値, 箱:第一ならび第三四分位数, 丸:箱の長さの2倍以上の値である外れ値)
箱ひげ図下の上部の数値:平均値, 箱ひげ図下の下部の数値:標準偏差を示す
アルファベットについては有意差を示す

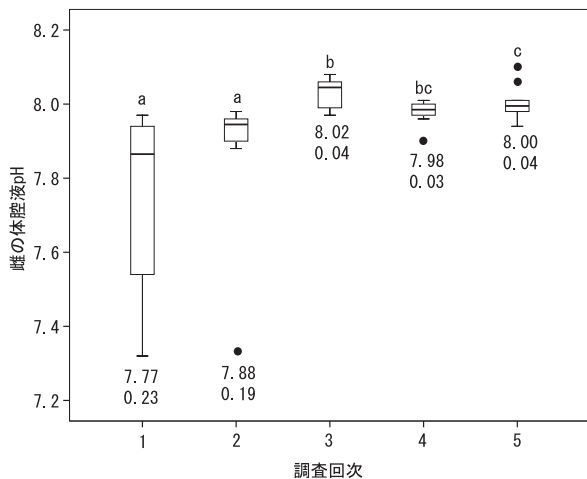


図5. 調査回次ごとの雌の体腔液pHの比較
箱ひげ図(水平線:中央値, 垂線:外れ値を除いた最大・最小値, 箱:第一ならび第三四分位数, 丸:箱の長さの2倍以上の値である外れ値)
箱ひげ図下の上部の数値:平均値, 箱ひげ図下の下部の数値:標準偏差を示す
アルファベットについては有意差を示す

考 察

今回の調査結果から、人工授精の実施期間の早期に該当する1～2回次に人工授精した卵の発眼率は、3～4回次と比較して低い値を示すことが明らかとなった。過去の事業成績*からも9月の下旬から10月の中旬にかけて人工授精を行った卵は、ふ化率が85%以下になる傾向が確認されており、人工授精実施期間の早期には、発眼率が低下する危険性が高いことがわかる。一方、1回次の各評価指標の測定値は3回次以降の測定値と比較して有意に低い値を示した。さらに、2回次の測定値も3～5回次の測定値と比較して値が低い、または、ばらつきが大きくなる傾向を示した。このように、人工授精時期の早期には、評価指標の測定値と卵の発眼率は同調していることがわかる。これより、体腔液pH、精子運動時間および精子運動率の測定値は、死卵のリスク評価の指標として有効であると考えられる。

これまでに宮本ら⁷⁾はサケの精液のスパマトクリット、体腔液pH、精子運動時間と体腔液のpHが発眼率に及ぼす影響を調査し、精子運動時間にのみ発眼率との間に有意な関係が認められることを報告している。本研究結果では、調査日ごとの精子運動時間と精子運動率の測定値は類似した傾向を示した。加えて、精子運動率は、発眼率50%以下を示した1回次において2～5回次の測定値よりも有意に低い測定値であったため、精子運動時間や体腔液pHと比較して、リスク評価の精度が高いことが考えられる。

体腔液pHは、発眼率の低かった1回次と2回次に、他の試験日より有意に低い測定値を示したことから、評価の指標として有効であると考えられた。発眼率と体腔液pHの関係について宮本ら⁷⁾が遊楽部川で調査した結果、体腔液pHは 8.0 ± 0.1 であり、個体間変動は小さく受精率への影響は認められないことを報告している。一方、本試験の1回次と2回次の測定結果は中央値、平均値ともに8.0以下と低く、ばらつきが大きい傾向を示した。これより人工授精時期の早期に発生するpHの低い体腔液が発眼率を低下させたことが考えられる。稲葉ら¹⁰⁾は体腔液に潰卵液が混入すると、体腔液内のpHの低下と受精時の精子の凝集を引き起こし、ニジマスの場合には混入率が3%以上になると発眼卵はほとんど見られなくなることを報告している。このように本調査の1回次や2回次で確認されたpHの低い体腔液には、潰卵液が混入していた可能性がある。

今回の調査結果が示すような、人工授精時期の早期に生じる発眼率低下の要因には、長期間の蓄養が挙げられる。天塩川捕獲場では、捕獲開始となる8月下旬に捕獲したサケ親魚の場合、20～30日間にわたる長期間の蓄養が必要となる²⁾。このため、蓄養期間の長い親魚群か

* さけますセンターふ化放流成績

ら授精作業を行う人工授精では、初日である1回次に人工授精に供試した親魚群が、最も長い蓄養日数を経た魚であったと考えられる。また、天塩川捕獲場は河口域からの距離が近いこと塩分の流入と高水温が認められている¹¹⁾。これらによりカジカ魚類のカマキリ *Cottus kazika* で報告されている¹²⁾ような長期間の蓄用、ストレスおよび不適切な蓄養環境による生殖障害の可能性も考えられるが、詳細な原因の究明については今後に残された課題である。

3回次以降に人工授精した卵の発眼率では、4回次が有意に高い値を示すのに対し、評価指標間では有意な差は認められなかった。この原因として、本試験では評価することの出来なかった未熟卵の混入の影響が推察される。今後はこれらの影響も含めて検討を行うことで、さらに精度の高い死卵のリスク評価が可能になると考えられる。

以上の結果より、人工授精に供する親魚の群から無作為に抽出した雌雄親魚の精子運動率、精子運動時間および体腔液 pH の測定値を用いて、死卵発生リスクの評価を行うことは可能であると考えられた。なお、リスク評価の際に判断の目安として使用する基準値については、50%以下の発眼率を示した調査日の体腔液 pH、精子運動時間および精子運動率の測定値とし、この基準値よりも測定値が下回る場合は、人工授精への使用を避けたほうが良いと考えられる。さらに、リスク評価の実施については低発眼率の問題が発生しやすい人工授精実施期間の早期に行うことが最も効率的であると考えられた。しかし、リスク評価の際の基準値については、サンプル数を増やすことで、今後より正確な基準値を調査研究する必要があると考える。

謝 辞

本研究を実施するに際して、社団法人留萌管内さけ・ます増殖事業協会の皆様には供試魚と収容卵数および発眼率のデータの提供をしていただいた。また、本論文をとりまとめるにあたり、千歳事業所の小村祐悦所長、平林幸弘調査係長および清水智仁研究員には有益なご助言をいただいた。記して厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) 独立行政法人さけ・ます資源管理センター (2004) 資源生物モニタリング 2002 サケ属魚類. Salmon Database 12.
- 2) 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, 29-38.
- 3) 広井 修 (1981) 4.3 サケ資源の初期減耗 特に人工ふ化放流における卵から稚魚放流までの減耗要因について. 漁業資源研究会議報 第 22 号, 漁業資源研究会議事務局, 東京.
- 4) 高橋 悟・戸叶 恒・高橋史久・伴 真俊 (2010) 人工授精作業におけるサケ親魚や精子・卵の放置時間が仔魚の浮上率に与える影響. 水産技術, 2, 91-98.
- 5) 平間美信 (2007) 民間さけふ化場で生産率が向上. 日本海 リサーチ&トピックス, 2, 3-5.
- 6) 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. 辻孔出版社, 14 pp.
- 7) 宮本幸太・高橋史久・佐田 巖・羅津三則・小松信治・桑木基靖・徳田裕志・吉田 昇・伴 真俊 (2010) 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. 北海道立水産孵化場研究報告, 64, 17-22.
- 8) LILEY, N. R., P. TAMKEE, R. TSAI, and D. J. HOYSACK (2002) Fertilization dynamics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effect of male age, social experience, and sperm concentration and motility on in vitro fertilization. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 59, 144-152.
- 9) MUNKITTRICK, K. R., and R. D. MOCCIA (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.
- 10) 稲葉伝三郎・野村 稔・富永 健 (1958) 養殖マス類の人工採卵改善に関する研究 - 人工授精に及ぼす潰卵の影響と洗卵法について. 日水誌, 23, 758-761.
- 11) 奈良和俊 (1997) サケ・マス類の親魚の捕獲時期別の蓄養日数調査. 魚と卵, 166, 13-27.
- 12) 田原大輔・岩谷芳自 (2007) カマキリ *Cottus kazika* 養成親魚の卵質評価指標と異常採卵の特徴. 日水誌, 73, 718-725.