

サケ・マス魚類の卵および精子の保存に関する研究— 2

サケ (*Oncorhynchus keta*) 精子の保存について

広井 修*, 安川 雅夫*, 末武 敏夫**

Studies on the Retention of Gametes in Salmonid Fishes —2.

On the Storage of Chum Salmon (*Oncorhynchus keta*) Sperm

Osamu HIROI*, Masao YASUKAWA* and Toshio SUETAKE*

Chum salmon (*Oncorhynchus keta*) sperm was obtained from 23 male fish run up the Chitose River, on 24th of November, 1972 and stored in the dark room showing the temperatures of 15.0°C, 8.0°C, 3.5±1.5°C and -9.0±9.0°C. Milt of one-cc was taken in 12-cc open glass vials. Mortality of the spermatozoa preserved was examined in the Ringer's solution at every day under a light microscope. Moreover, a lot of milt stored in each condition for 4 or 7 days, to assess fertility, was employed to inseminate the eggs preserved for 1 or 4 days in the Ringer's solution of 8.0°C. The results obtained were as follows:

1. Spermatozoa stored at the temperature of 15.0°C, 8.0°C and 3.5±1.5°C maintained the active mortality for 2, 6 and 11 days, respectively. No mortality, however, was shown by the milt stored at -9.0±9.0°C even one day after preservation.
2. Microbes of rod-, globe- or long spindle-shape were observed the milt preserved at 3.5±1.5°C, 8.0°C and 15.0°C. They became visible in earlier time and increased more rapidly as the milt was exposed at higher temperature.
3. The lot of milt stored for 4 days at 8.0°C could fertilize 89.3% of the eggs which were preserved for 1 day at 8.0°C in the Ringer's solution. When the eggs stored for 1 or 4 days in the Ringer's solution of 8.0°C was inseminated with the sperm kept for 4 or 7 days at 3.5±1.5°C, fertilization rates of 96.9% and 53.8%, respectively, were obtained.

ま え が き

さけ・ますの人工ふ化事業において、悪環境条件での採卵に起因する不受精卵の発生および過密度蓄養による親魚の衰弱・斃死は近年、特に回帰親魚が増加するにつれて、頻繁にみられる様になり、これらの防止対策が強

く要望されている。これらの問題の多くは精子および卵を正常な受精力を維持したまま長期間保存する方法が確立できるならば解消するであろう。

サケ・マス魚類の精液の保存に関する研究はこれまで、サケ、*Oncorhynchus keta* (山本, 1949, Barrett, 1951; 岡田・伊藤, 1955; 岡田外, 1956; 寺尾, 1960), ベニマス, *O. nerka* (Foerster, 1965; Withler & Humphreys, 1967), サクラマス, *O. masou* (中野・野沢, 1925), マスノスケ, *O. tshawytscha*, スチール・ヘッド, *Salmo gairdnerii gairdnerii* (Smith & Quistorff, 1943), ニジマス, *S. gairdnerii irideus* (橋本, 1961) および大西洋サケ, *S. salar* (Truscott et al., 1967; Hoyle & Idler, 1968) を用いて行なわれている。そしてこれらの実験から、いくつかの有効な保存方法が示されたけれども、実用に供する為には尚検討の必要がある。

著者らはサケ (*O. keta*) の精液を容易に準備できる条件で保存実験を行なったのでその結果を次に報告する。

稿を進めるに先だち、本研究について懇篤なる御指導と御助言を賜わった北海道大学水産学部、山本喜一郎教授に厚く御礼申し上げます。また、本研究に用いたサケ卵および精子の採取に多大の便宜を賜わった北海道さけ・ます増殖事業協会、三原健夫会長、同西越捕獲場、布施智常氏および同捕獲場の皆様に深甚の謝意を表します。

材料および方法

本研究に用いたサケ (*Oncorhynchus keta*) の精液は1972年11月24日に石狩川水系千歳川の北海道さけ・ます増殖事業協会西越捕獲場で得られた3年魚21尾および4年魚2尾から搾出した。尿又は血液等の混入精液は搾出時に注意深く観察しながら取除き、可能な限り純粋な精液のみを採取した。搾出時の室温は10.5℃であった。搾出した精液は車で約20分を要する北海道さけ・ますふ化場千歳支場ふ化室まで氷冷運搬した。運搬後すぐに、精液は洗滌滅菌した広口ガラス瓶 (12cc) 130本に駒込ピペットで各々1cc毎に小分けした。精液を入れた瓶は水分、ゴミ等の混入を防ぐ為に、ゴム栓を通気を妨げない程度に軽く置いて、すぐに実験条件下に静置した。この間のふ化室の室温は6.0℃であった。

精子は次の4つの実験区に分けて保存した。実験—1：暗室 (消灯) 内にヒーターを用いて水温を15.0℃に調節した止水槽を置き、その中に精液を入れた瓶を浸漬した。実験—2：暗室 (消灯) 内で8℃の流水 (湧水) に精液を入れた瓶を浸漬した。実験—3：冷蔵庫 (日立) の冷蔵室 (室温3.5±1.5℃) に精液を入れた瓶を静置した。実験—4：冷蔵庫 (日立) の冷凍室 (室温-9.0±9.0℃) に精液を入れた瓶を静置した。

各実験区とも毎日精子の活力を調べた。精子の活力は各実験区毎に小瓶から精液をスライド・グラスにとり、それにサケ用生理食塩水 (山本, 1948) を加えて精子の運動能力を光学顕微鏡下で観察する方法で判定した。

さらに、保存4日間および1週間の精子は夫々、1日および4日間8℃で生理食塩水に保存した同腹未受精卵を用いて、受精率を調べた。同腹未受精卵は1972年11月27日同捕獲場で得た3年魚 (フオーク・レングス, 74.2 cm, 体重4,800 g) から採取した。未受精卵の保存方法は前報 (高野外, 1973) と同様である。

結 果

採取当日の精子は生理食塩水で稀釈することにより活発な運動を示した。精子は生理食塩水滴下後25秒間は活発に運動するが、その後運動は急速に減衰し、30秒以降では僅かに動くのみであった。この精液で採卵後2時間生理食塩水に保存した未受精卵を媒精したところ97.0% (未受精卵の67粒中の65粒が受精) の受精率を得た。

実験—1 暗室内で15℃の温度の下で保存した精液

実験期間を通じて、保存瓶を浸漬した止水槽の水温および室温は夫々、15.0±0.5℃および7.0±3.0℃の日間変化を示した。

精子は保存後2日間は採卵当日と変わりなく生理食塩水で稀釈することにより活発な運動を示した。ところが保存3日目では一部の精子が極めて弱い運動を示すのみであり、しかも精液中には桿形、球形および長紡錘形の細菌が観察された。4日目になると、これらの細菌はさらに増え、精子は殆んど運動しなかった。この精液で1日間生理食塩水に保存した未受精卵を媒精したところ、受精卵は得られなかった (表—1)。保存後5日目には精液は採取時の乳白色から黄白色に変わり、透明な液状部分が分離してみられた。精液は大部分細菌で占められ、

Table. 1. Mortality and fertility of the preserved sperms in various conditions

The mark, ++, + and -, represents the grade of sperm mortality; ++, most of spermatozoa move actively, +, a part of spermatozoa show activity and -, none of spermatozoa show activity in the Ringer's solution. Fertility of spermatozoa was determined by the test which inseminated the eggs preserved in the Ringer's solution.

表—1 保存精子の活力と受精力

Days after preservation		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Expt. 1 15°C	Mortality	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Fertility (%)				0			0																	
Expt. 2 8°C	Mortality	++	++	++	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Fertility (%)				89.3			0																	
Expt. 3 3.5±1.5°C	Mortality	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	Fertility (%)				96.9			53.8																	
Expt. 4 -9±9°C	Mortality	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Fertility (%)				0			0																	

++: 全ての精子が運動力を持つ
 +: 一部分の精子が運動力を持つ
 -: 精子は運動力を示さない

完全な形の精子は殆んどみられず、僅かに変形した球形小型の精子の頭部のみがみられるのみであった。

実験—2 暗室内で8°Cの温度の下に保存した精液

保存瓶を浸漬した流水水温は実験期間を通して8.0°Cであった。室温は実験—1の場合と同様である。

精子は保存後6日間まで活発な運動力を示した。精液は保存期間が長くなるにつれて粘性が高くなった。4日間保存の精液を用いて8°Cの生理食塩水に1日間保存した未受精卵を媒精したところ、89.3%の受精率を得た(表—1)。しかし7日間保存した精子は生理食塩水を滴下しても何ら反応を示さず、精液中には細菌が繁殖していた。この精液で4日間保存した未受精卵を媒精した結果、受精卵は得られなかった(表—1)。保存8日以降の精液は黄白色に変わり、完全な形の精子は認められなかった。

実験—3 冷蔵庫で3.5±1.5°Cの下に保存した精液

冷蔵庫の冷蔵室の室温は実験期間を通して、3.5±1.5°Cを示していた。

精子は保存後11日間活発な運動を示したが、精液は保存期間が長くなるにつれて粘性を増した。4日間および7日間保存した精液で8°Cの生理食塩水に夫々1日および4日間保存した未受精卵を媒精したところ、夫々96.9%および53.8%の受精率を得た(表—1)。この受精率は同様に保存した未受精卵を新鮮な精液で媒精した場合とあまり変わらない成績であった(1日間保存, 97.2%; 4日間保存, 47.8%: 高野外, 1973)。一方、保存後12日から18日になると一部の精子のみが生理食塩水に対し反応を示す様になり、さらに保存日数が増すに従い、運動する精子の数は減少した。さらにこの期間に精液中に細菌の繁殖がみられ、保存期間が長くなるにつれて増加した。保存後19日以降では精子の活動は認められなくなり、それに代って細菌は急速に増加した。保存22日目以降では精液の殆んどが細菌で占められ、正常な形の精子がみられなくなると同時に精子は乳白色から黄白色に変わった。

実験—4 冷蔵庫で-9±9°Cに凍結保存した精液

冷蔵庫の冷凍室の室温は実験期間を通して、-9.0±9.0°Cであった。

精子は18日間保存したが、いずれの日にも活動力がみられなかった。もちろん4日および7日の受精の際も受精卵は得られなかった(表—1)。凍結した精液を室温で溶解させた後では精液は凝縮した精子の部分と液状の部分に分離した。精液中には細菌の発現はなかった。

考 察

岡田・伊藤 (1955) はサケ (*Oncorhynchus keta*) 精液をいくつかの温度条件で保存し、淡水中の精子の運動力と新鮮な未受精卵に媒精した場合の受精力 (受精率) を比較した。その結果、0℃、5℃および11℃で保存した精液は活力喪失の殆んど直前まで受精力を保有することを確めた。この事実がそのまま我々の実験にあてはめ得るならば、生理食塩水賦活により、精子の殆んどが活発に運動した期間、即わち、15.0℃で2日間、8.0℃で6日間、3.5±1.5℃で11日間精子は受精力を保有したと考えられる。我々の結果は低温程精子の受精力が長期間保持されることを示している。同様の事実は比較的短期間の試験ではあるが、同じくサケで山本 (1949) によって述べられている。山本 (1949) は3~6℃に保存した精液中の精子は8時間まで活動力も受精力も搾出直後と殆んど変わらず、16時間後でも大部分のものが活発に運動するが、13~16℃の温度では3時間後で既に不活性な精子が認められ、5時間後ではすべての精子が活動力を示さなくなると報告している。保存温度と精子の活力保有期間に関連して、岡田・伊藤 (1955) は5℃から33℃までの8段階の温度でサケ精液を保存した結果から、保存温度 (x) と精子の活力保有期間 (y) の間に $x(y + 1.1) = 45$ の曲線的相関があることをみつけた。我々の場合の保存温度は岡田・伊藤 (1955) のそれと異なるが、得られた結果は彼等の相関式を支持した。

Barrett (1951) は2.5~5.8℃の温度でサケ精液を保存した場合、受精力 (90%以上の受精率) は36時間後までしか保持されないと報告している。我々の結果では類似の温度 (3.5±1.5℃) で保存し24日後でも96.9%の受精率を得ており、Barrettの結果よりはるかに良い成績を得た。この相違は保存容器の通気効果の差によって生じたものと推定される。ベニマス (*O. nerka*) の精子は5℃で密栓して保存すると26時間 (Foerster, 1965)、8~9℃では11時間 (Withler & Humphreys, 1967) 以降で顕著な受精力の減衰がみられている。精液を25ccの瓶に2.5cc入れて密栓して、8~9℃で保存したカラフトマス (*O. gorbuscha*) 精子では33時間後で受精率の降下がみられている (Withler & Humphreys, 1967)。同様に保存容器一杯に精液を入れて密栓し、6.1~7.0℃で保存するとスチール・ヘッド (*Salmo gairdnerii gairdnerii*) では2.5時間後で、マスノスケ (*O. tshawytscha*) では5時間後で受精力が減衰する (Smith & Quistorff, 1943)。ところが湖水産サクラマス (*O. masou*) の精液を70ccの容器に入れて密閉し、6.0~13.0℃で保存すると4日 (97時間) 後でも受精力 (受精率95.2%) を保持している (中野・野沢, 1925)。この場合では保存容器の容積が大きいため、精子は長時間空気の供給を得たものと推察される。Truscott et al. (1967) は大西洋サケ (*S. salar*) の精液を20ccの瓶に1cc入れ、通気して2.0℃で保存すると5日間新鮮な精子と殆んど変わらない受精率を示すが、同じ条件で密栓して保存すると1日後で既に受精率は60%以下に降下すると報告している。彼等は密封した場合は精子の代謝によって生じる二酸化炭素ガスの毒性、ガスによる精液のpHの降下、又は酸素不足によって精子が害されると考えている。このような空気の遮断の影響は通気して保存したサケ精液の場合でも精液の空気と接触しない内層部に認められ、内層部の精子の活力保有期間は空気に接している表層部に比して著しく差があることが知られている (岡田・伊藤, 1955)。同じく、岡田・伊藤 (1955) はサケ精液を1ccアンプルに一杯に詰めて密封し、空気を遮断して保存したところ、精子は0℃では約3時間、11℃および20℃では約1時間で活力を喪失するが、その後空気に接触させておくと、次第に活力を回復し、しかも低温程より短時間で活力を取戻すことを観察した。この結果について、彼等は空気遮断によって炭酸ガスの蓄積が高まり精子を麻痺させていたものが、通気によって炭酸ガスの拡散と酸素の供給がなされて、精子は麻痺状態から解放されることを意味すると述べている。又、酸素消費量で観察した精子の基礎代謝は温度が高い程大きくなるのがサケ精液で報告されている (岡田外, 1956)。即わち、精液1ccは10.8℃で1時間に21mm³の酸素量を消費するが、18.7℃ではその量は約4.5倍の94mm³にも達する。

これらの事実および我々の結果は精子の保存に際して、1) 精液が空気に接する表面積を充分大きくとれる容器を用いること、2) 充分な通気を行なうこと、および3) より低温に置くことが重要であることを示している。

我々は実験期間を通して細心の注意をはらったにもかかわらず、常温で保存した精液のいずれにも細菌の繁殖がみられた。細菌の出現および繁殖の速度は高温程早かった。いずれの場合も、保存精子の活力が喪失する以前に細菌が出現し、細菌が増加する時点で精子の活力の低下がみられ、精子の死後急激に繁殖する。このことは細菌が精子の活力保有に対して大きな影響を与えているように思われる。サケ精液保存中の細菌の出現については

寺尾 (1960) が 2~4℃ の保存実験で報告し、家畜の精液保存等で用いられている抗生物質の必要性を強調している。細菌は精液自体から、又空気から由来すると考えられ、これを排除することは極めて困難である。何故ならば、先に述べたように常温下での精液の保存には通気が絶対条件となるからである。このことから、精液を長期間保存する為には細菌の繁殖を阻止しうる凍結保存法を考える必要があろう。

我々はサケ精液を $-9.0 \pm 9.0^\circ\text{C}$ で凍結保存したところ、実験期間 (22日間) を通して、細菌の出現はみられなかったが、精子の活力も又、完全に喪失することを確認した。これは明らかにサケ精子の保存の場合にも適当な保存稀釈液が必要であることを示している。魚類精子の 0℃ 以下の保存に関して、いくつかの報告がみられる。Blaxter (1953) はニシン (*Clupea harengus*) の精液を海水の 12.5% グリセリン溶液で稀釈し、ドライ・アイス (solid carbon dioxide) を用いて、 -79.0°C に凍結保存したところ、約 6ヶ月保存後で 80% および 85% の受精率を得ている。Truscott et al. (1967) は大西洋サケ (*S. salar*) の精液を 5% DMS (dimethyl sulphoxide) で稀釈し、 -4.5°C で保存 28 日後に 81% の受精率を、又 5% EG (ethylene glycol) で稀釈し、 -3.0°C で 38 日後に 70% の受精卵を確認した。サケ精液では寺尾 (1960) が $-40 \sim -50^\circ\text{C}$ で生理食塩水に稀釈した場合 2 日間、5% 又は 10% グリセリン液で 3 日間、15% グリセリン液で 4 日間、卵ク液 (3% クエン酸ソーダに等量の鶏卵黄を混合) で 1 日間精子は活力を保有することを報告している。これらの結果を参考として、サケ・マス魚類精液のより有効な、より簡便な凍結保存法に関する基礎研究を進める必要があろう。

さて、我々は常温の $3.5 \pm 1.5^\circ\text{C}$ で 7 日間、 8.0°C で 4 日間サケ精液を確実に保存しえた。しかも $3.5 \pm 1.5^\circ\text{C}$ は市販の冷蔵庫の冷蔵室保存であり、 8.0°C はふ化用水に浸しただけの極めて簡単な方法であることはさけ・ます人工ふ化事業の中に手軽に応用しうる利点をもっている。実際にこの研究の中で示したように冷蔵庫 ($3.5 \pm 1.5^\circ\text{C}$) に 4 日間保存したサケ精液を同じく生理食塩水に入れて 8.0°C で 1 日保存した未受精卵に媒精したところ正常な採卵に劣らない 96.9% の受精率を得た。これらの結果が今後ふ化事業の中で、作業能率の向上、過密度蓄養の解消又は悪条件下での採卵から生じる未受精卵の解消等に応用されうらば、この上ない幸いである。

要 約

石狩川水系千歳川で捕獲したサケの雄完熟魚 23 尾から搾出した精液の保存実験を行なった。

1. 精液を 15.0°C で暗室 (消灯) 内に保存した場合、精子は 2 日間、 8.0°C で暗室 (消灯) 内に保存の精子は 6 日間、冷蔵庫の冷蔵室 ($3.5 \pm 1.5^\circ\text{C}$) に保存の精子は 11 日間、夫々新鮮な精子と同じ活力を保持した。しかしながら、冷蔵庫の冷蔵室 ($-9.0 \pm 9.0^\circ\text{C}$) に凍結保存した精子は 1 日後で既に活力を喪失していた。
2. 常温保存の精液にはいずれにも、桿状、球状又は長紡錘状の細菌の繁殖がみられ、しかも細菌の出現および繁殖速度は高温程速かった。細菌は精子の活力喪失以前に出現し、精子の活力喪失時まで徐々に増加し、精子の死後、急激に繁殖した。
3. 8.0°C で 4 日間保存した精子を 8.0°C で 1 日間生理食塩水に保存した未受精卵に媒精したところ、89.3% の受精卵を得た。 $3.5 \pm 1.5^\circ\text{C}$ に 4 日間および 7 日間保存した精子を 8.0°C で生理食塩水に夫々 1 日間および 4 日間保存した未受精卵に媒精したところ、96.9% および 53.8% の受精率を得た。

文 献

- Barrett, I. 1951. Fertility of salmonid eggs and sperm after storage. J. Fish. Res. Bd. Canada 8, 125-133
- Blaxter, J. H. S. 1953. Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring. Nature 172, 1189-1190
- Foerster, R. E. 1965. Effect of retention of spermatozoa and ova of sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*, in water and without addition of water, on fertility. J. Fish. Res. Bd. Canada 22, 1503-1521
- 橋本進 1961. ニジマスの貯蔵精子の賦活について—予報. 水産増殖 9, 133~142
- 広井修・安川雅夫・末武敏夫・佐々木正三・富田竹雄・佐藤幸男 1973. 8°C の湧水に於けるサケ (*Oncorhynchus keta*) 卵の発生について (予報). さけ・ますふ研報 27, 25-30

- Hoyle, R. J. & D. R. Idler 1968. Preliminary results in the fertilization of eggs with frozen sperm of Atlantic salmon (*Salmo salar*). J. Fish. Res. Bd. Canada 25, 1295-1297
- 中野宗治・野沢鑑 1925. 鱒の卵及精子の活力試験. 水産報告, 21, 17, 42-53
- 岡田鶴・伊藤哲司 1955. 鮭人工孵化における不受精現象の研究 (第 1 報) 精子の活力と受精力について. 水産報告 10, 21-31
- 岡田鶴・石川嘉郎・木村義一 1956. 鮭人工孵化における不受精現象の研究 (第 2 報) 精子及び卵子の生存能力について. 水産報告 11, 7-17
- Smith, R. T. & E. Quistorff 1943. Experiments with the spermatozoa of the steelhead trout, *Salmo gairdnerii gairdnerii*, and the chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. Copeia 1943, 164-167
- 高野和則・広井修・安川雅夫・末武敏夫 1973. サケ・マス魚類の卵および精子の保存に関する研究—1. サケ (*Oncorhynchus keta*) 未受精卵の保存について. さけ・ますふ研報 27, 31-38
- 寺尾俊郎 1960. 魚類精液の長期保存方法について. 魚と卵 11, 4-6
- Truscott, B., D. R. Idler, R. J. Hoyle & H. C. Freeman 1968. Sub-zero preservation of Atlantic salmon sperm. J. Fish. Res. Bd. Canada 25, 363-372
- Withler, F. C. & R. M. Humphreys 1967. Duration of fertility of ova and sperm of sockeye (*Oncorhynchus nerka*) and pink (*O. gorbuscha*) salmon. J. Fish. Res. Bd. Canada 24, 1573-1578
- 山本喜一郎 1948. 鮭卵の人工賦活について. 科学 18, 131-132
- 山本喜一郎 1949. サケ及マス卵の受精方法に就ての考察. 水産報告 4, 33-46