

## アワビ属精液の凍結保存に関する研究 — 予報

松永浩昌\*・岩田伸弘\*\*・黒倉寿\*\*\*・平野礼次郎\*\*

(\*南西海区水産研究所, \*\*東京大学農学部, \*\*\*広島大学生物生産学部)

1983年5月2日受理

### A Preliminary Study about Cryopreservation of Abalone Sperm.

Hiromasa MATSUNAGA \* Nakahiro IWATA \*\* Hisashi KUROKURA \*\*\* and  
Reiji HIRANO \*\*

\* *Nansei Regional Fisheries Research Laboratory, Ohno-cho, Saeki-gun,  
Hiroshima*, \*\* *Faculty of Agriculture, The University of Tokyo,  
Tokyo*, \*\*\* *Faculty of Applied Biological Science, Hiroshima  
University, Fukuyama*

(Table 1-2)

### 緒 言

アワビ属は定棲生活をするという生態的特性のため、種苗の放流効果が高く、我国における種苗生産の主要な対象種の一つになっている。ことに近年、紫外線照射海水法<sup>1)</sup>、過酸化水素添加法<sup>2)</sup>等の産卵誘発技術の開発により、受精卵の獲得が容易になり、種苗の生産量が増加している。この現状は、栽培漁業の振興という観点からは好ましいものであるが、反面、放流種苗の増加は、自然な交配によって再生産された群を圧迫し、やがて、種苗生産用の親貝をも、放流種苗にたよる事態を招く危険性もある。このとこは、数代にわたり、近親交配が繰り返され、結果的に、限られた遺伝形質を持ったアワビが、自然海域に卓越することを意味する。このような弊害を避けるために、異なる系統間での交配を可能にするための技術を、種苗生産の技術とともに開発することが必要と思われる。精液の凍結保存は、そのための技術として有効なものの一つである。精液の凍結保存は、牛など家畜精液ではすでに実用化され、日常的に用いられている。また、魚類精液では、ごく最近、ほぼ新鮮精液のレベルに、精液の授精能力を保つことが可能になった。<sup>3,4)</sup>しかし、海産無脊椎動物では、ヒトデ・ウニ<sup>5)</sup>・カキ<sup>6,7)</sup>で、数例の報告がなされているにすぎない。本研究では、アワビ属の中で、種苗生産の対象となっているクロアワビ・マダカアワビを用いて、精液の凍結保存を試み、いくつかの条件を検討した。

### 材料および方法

精液および卵は、神奈川県水産試験場栽培漁業センター（神奈川県三崎市）において、種苗生産用の親貝として養成されたマダカアワビ（*Haliotis gigantea*）およびクロアワビ（*Haliotis discus*）より採取した。精液の採取は以下の操作で行った。生殖巣の発達を肉眼で確認したアワビを、ガラス製透明バットに入れ、45～60分間、屋外で乾出した後、バットの中に紫外線照射海水を入れて流水状態に保つ、その後、呼水孔から精液が放出されるのを確認し、空中で精巣を圧迫して、呼水孔から滴下する精液を採取する。放精は通常、紫外線照射海水に浸漬後、2～3時間で開始された。精液の凍結はメタノール・ドライアイスによって行った<sup>8)</sup>。すなわち、希釈液、抗凍結剤を加えた精液を、牛精液保存用、細型ストロー管（0.5 ml容、富士平工業製）に封入し、口径16mmのガラス製試験管に、ストロー管5本を入れ、メタノール

ル・ドライアイスに漬けた。その後、この状態で約2時間かけて、東京大学農学部へ輸送し、液体窒素中に保存した。希釈液には、海水を用い、抗凍結剤には、グリセリンおよびDMSO（ジメチルスルホキサイド）を用いた。精液の希釈率は12%（全液量に対する百分比）とし、抗凍結剤の濃度は精液を含む全液量に対する容量比として表わした。解凍は、ストロー管をメタノール・ドライアイス中の試験管に移し、再び前述の栽培漁業センターに輸送し、ストロー管を室温の水に漬けて行った。解凍した精液はただちに、精子の運動性の確認、新鮮精液に媒精した。精子の運動性は、少量の精液を顕微鏡下で海水と混合し、直進運動する精子の割合を判定し、運動する精子の割合を全精子に対する百分比として表わした。授精実験に用いた卵は、放精の誘発と同様の方法で産卵を誘発した母貝から採取した。ただし、放卵は海水中で行なわせ、海水中に懸濁した卵を授精に供した。媒精は50mlビーカー中で行い、卵を懸濁した海水1mlをビーカーにとり、精液0.5mlを媒精した。1mlの海水はほぼ4000~6000個の卵数に相当し、凍結精液0.5mlは原精液として0.06mlに相当する。その後、この状態で20分経過した後、海水50mlを加え、さらに30分経過後に海水を交換し、2~3回洗卵した。授精実験の結果は、媒精24時間後に卵の発生を観察して判定した。精子の密度は血球算定盤を用いて計数した。

## 結 果

採取された精液は、海水希釈前にすでに活発に運動していた。この精液を、2日間、室温に放置したと

Table 1. Motility of cryopreserved sperm and percentages of eggs reached veliger stage achieved from the insemination of cryopreserved sperm.

species	equilibration period (min.)	cryoprotectant	% larvae	motility (%)	days stored
<i>H. gigantea</i>	8	4% glycerol	87*	40	24
	8	8% glycerol	93*	30	24
	8	12% glycerol	93*	40	24
	33	4% glycerol	87*	40	24
	33	8% glycerol	92*	50	24
	33	12% glycerol	85*	20	24
	5	4% DMSO	81	50	5
	5	8% DMSO	60	50	5
	20	4% DMSO	77	50	5
	20	8% DMSO	—	50	5
	40	4% DMSO	73	50	5
	40	8% DMSO	20	50	5
	60	4% DMSO	40	50	5
	60	8% DMSO	3	50	5
<i>H. discus</i>		control**	95*	90	—
	5	4% glycerol	63	10	7
	5	8% glycerol	37	5	7
	5	12% glycerol	14	25	7
	6	16% glycerol	3	25	7
		control**	90*	90	—

\* mean of 2 replications

\*\* percentage of eggs reached veliger stage from same eggs inseminated with fresh sperm.

ころ、新鮮精液と同様の運動性を保っていた。精子密度は、マダカアワビで  $6.3 \sim 11.0 \times 10^8$  個  $1 \text{ ml}$ 、クロアワビで、 $1.3 \sim 6.1 \times 10^8$  個  $1 \text{ ml}$  であった。また、海水中で放精中のアワビの呼水孔付近から採取した精子海水の精子密度は、マダカアワビで  $3.9 \sim 4.2 \times 10^7$  個  $1 \text{ ml}$ 、クロアワビ  $3.9 \sim 4.3 \times 10^7$  個  $1 \text{ ml}$  であった。精液を凍結保存した後の活力および授精試験の結果は Table 1 に示した。マダカアワビでは、平衡時間・濃度にかかわらず、DMSO を抗凍結剤にした精液で活力が高い傾向が見られた。新鮮な精液を媒精した卵は、24時間後には、ほぼすべてがベリジャー幼生に達していた。ベリジャー幼生に達していない卵は、まったく卵割が進んでいなかった。グリセリンを抗凍結剤として凍結保存した精液を媒精した卵のうち、ベリジャー幼生に達した卵の割合は、グリセリンの濃度・平衡時間にかかわらず、90%前後であり、ほぼ、新鮮な精液を媒精した卵での割合に相当した。DMSO を抗凍結剤とした場合には、幼生の割合は低く、抗凍結剤の濃度について比較すると、8%のものは、4%に比べ、さらに割合が低かった。この傾向は、平衡時間が長くなるほど著しかった。クロアワビでは、グリセリンのみを抗凍結剤に用いた。ベリジャー幼生に達する割合は、マダカアワビに比べて低く、グリセリンの濃度が増すにつれて、幼生の割合は低下した。

DMSO を抗凍結剤とした場合に、幼生に達する卵の割合が低下する原因を明らかにするため、マダカアワビを材精として、DMSO を含む海水中で、新鮮精液を新鮮な卵に媒精し、幼生の割合を調べた (Table 2)。DMSO の添加量は 4% ( $V/V$ ) とした。この濃度は、媒精時には、8% の DMSO を含

Table 2. A comparison of percentages of larvae achieved from three insemination tests: insemination with preserved sperm using 8% DMSO, insemination with fresh sperm in the seawater containing DMSO and insemination with fresh sperm in normal sea water.

insemination	% larvae	number of replications
insemination with preserved sperm	38	4
insemination with fresh sperm in the sea water containing DMSO	46	2
insemination with fresh sperm in normal sea water	97	2

んだ精液を媒精した場合の濃度に相当する。その結果、新鮮な精液でも、媒精時に DMSO が存在すると、幼生の割合は低下した。その割合は、DMSO を抗凍結剤とした精液を媒精した卵に、ほぼ相当した。この実験で、ベリジャー幼生に達しなかった卵は、まったく卵割していなかったが、ジェリー層には多くの精子が侵入していた。

このほか、海水中に放出された精子を用い、精子海水の状態で、5~10%の濃度でグリセリンを添加し、凍結保存を試みたが、精子の運動性は保たれたものの、媒精後、ベリジャー幼生に達する卵は得られなかった。

## 考 察

海水を希釈液とし、グリセリンを抗凍結剤とすることにより、比較的容易に、マダカアワビ、クロアワビ精液を凍結保存することが可能であることが示された。凍結保存精液を媒精した卵から、ベリジャー幼生に達した卵の割合は、新鮮精液を媒精した卵での割合に相当した。しかし、この結果は、凍結保存精液の授精能力が新鮮精液のレベルに保たれていることを意味しない。菊地・浮<sup>9)</sup> はエゾアワビ (*Haliotis discus hennai*) を材料として、精子密度と受精率の関係を検討している。それによれば、精子密度  $7 \sim 10 \times 10^4$  個  $1 \text{ ml}$  の精子海水で媒精を行えば、ほぼ 100% の受精率が得られ、これ以下の精子密度では受精

率は低下する。  $1.9 \times 10^6$  個  $1\text{ ml}$  以上の精子海水中では、過剰な精子のために卵膜が溶解し、受精率の低下、発生の異常などがおこる。本研究で用いた媒精方法での、媒精時の精子密度を原精液の精子密度から計算すると、凍結精液（マダカアワビの場合）で、  $2.5 \sim 4.4 \times 10^7$  個  $1\text{ ml}$  であり、菊地・浮の最適精子密度の上限より、さらに10倍以上高い濃度である。対照として、新鮮精液を媒精した卵でも、90%以上の割合でベリジャー幼生に達していることから、過剰な精子による悪影響は、洗卵により避けられたものと思われる。しかし、凍結精液の授精能力を正しく評価するためには、最適精子密度の下限付近で、授精試験を行う必要がある。海水中に放出された精子（精子海水）を凍結保存した結果、運動性は保たれていたものの、ベリジャー幼生に達する卵は見られなかった。この際の精子密度は、  $1.4 \sim 1.7 \times 10^6$  個  $1\text{ ml}$  と計算され、前述の最適精子密度の上限に相当する。 Zeel, S.R.<sup>7)</sup> は、カキ精液の凍結保存を試み、切り出し法によって、精巣から直接に採取した精液の凍結保存は容易であるが、海水中に放出された精子の保存には、成功しなかったことを報告している。したがって、精子海水での実験の結果を、そのまま濃厚な精液にあてはめることには危険がある。しかし、凍結精液の授精能力の低下は、精子の運動性の低下からも窺える。精液の凍結保存を実用化するためには、今後さらに、希釈液、抗凍結剤、凍結方法、媒精法など、諸々の条件を検討する必要がある。

そのような改良の一つとして、抗凍結剤として、DMSOを用いることが考えられる。DMSOを抗凍結剤に用いた精液の運動性は高く、抗凍結剤としての使用は、検討に値する。本研究で用いた媒精方法では、DMSOを含む凍結精液を媒精した卵から、ベリジャー幼生に達する卵の割合は低かった。この原因を検討するため、DMSOを含んだ海水中で卵に新鮮精液を媒精して、通常の海水中で媒精した卵と比較した。DMSOを含んだ海水中で媒精した卵のうち、ベリジャー幼生に達した卵の割合は、DMSOを抗凍結剤として、凍結保存した精液を媒精した卵に相当する割合に低下した。幼生に達していない卵は、卵割しておらず、発生過程での死亡は認められなかった。また、卵割の見られない卵のジュリー層には、多くの精子が侵入していた。アワビの未受精卵は、厚いジュリー層（ $30\ \mu\text{m}$ ）を持ち、精子の先体反応はジュリー層の卵膜に近い部分で起ることが知られている<sup>10)</sup>。このことから、本研究での結果は、DMSOが、先体反応から第1卵割までのいずれかの過程を妨げたためと考えられる。なお、本研究に先だち、クエン酸ソーダ液を希釈液として、精液を凍結保存し、新鮮な卵に媒精したところ、同様の現象が認められた。近年、アワビ卵の授精過程には、詳細な研究がなされている<sup>11)</sup>。精液凍結保存に関する研究においても、凍結方法等の諸条件の検討に加えて、授精過程の詳細な追跡が必要と思われる。

## 引用文献

- 1) 菊地省吾・浮永久：東北水研究，**33**，79-86（1974）。
- 2) 田中弥太郎：東海水研報，**96**，93-101（1978）。
- 3) STEIN, H. and BAYRLE, H. : *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **18**, 1073-1076 (1978) .
- 4) STOSS, J. and REFSTIE, T. : *Aquaculture*, **30**, 229-236 (1983) .
- 5) DUNN, R.S. and McLACHLAN, J. : *Can. J. Zool.*, **51**, 666-669 (1973) .
- 6) LANNAN, J.E. : *Genetics*, **68**, 599-601 (1971) .
- 7) ZELL, S.R., BAMFORD, M. H. and HIDU, H. : *Cryobiology*, **16**, 448-460 (1979) .
- 8) KUROKURA, H. and HIRANO, R. : *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **46**, 1493-1495 (1980) .
- 9) 菊地省吾・浮永久：東北水研報，**84**，67-71（1974）。
- 10) SAKAI, Y.T., SHIROYA, Y. and HAINO-FUKUSHIMA, K., : *Develop. Growth and Differ.*, **24**, 531-542 (1982) .
- 11) LESIS, C.A., TALBOT, C.E. and VACQUIER, V.D.: *Develop. Biol.*, **92**, 227-239 (1982) .

### SUMMARY

Several experiments were preliminarily performed to find out a simple and sure cryopreserving method of abalone sperm. Using glycerol as a cryoprotectant, abalone sperm was successfully cryopreserved. The highest percentage of eggs which developed to the veliger stage from those inseminated with cryopreserved sperm was 93%. The motility of sperm which was cryopreserved by using DMSO as a cryoprotectant was higher than that of sperm preserved with glycerol, though the percentage of larvae developing from eggs inseminated with DMSO preserved sperm was lower. Through the insemination tests of fresh sperm in sea water containing DMSO and subsequent microscopical observation, it was inferred that the low fertility of sperm cryopreserved with DMSO was caused by some harmful effects of DMSO on the spermatozoa or eggs somewhere in the process between the acrosome reaction of spermatozoon and the first cleavage of the egg.