

アコヤガイ凍結保存法による新養殖システム開発

青木秀夫・林 政博

目 的

日本産アコヤガイの遺伝資源としての保存、および種苗生産における親貝の系統保存の省力化を図るため、液体窒素を用いたアコヤガイの精子、胚（幼生）、外套膜の凍結保存技術を開発することを目的とする。

「精子の凍結保存技術の開発」では、昨年度の試験で凍結用保存液の組成、凍結速度、液体窒素に浸漬するまでの到達温度の適切な条件を明らかにした。適切な条件で凍結しても、解凍した精子の運動率は凍結前に比べて30～40％に低下した。そこで本年度は、凍結保存した精子の受精能力を検討するとともに、凍結精子の運動能力や受精能力が低下する要因に関して、精子の鞭毛と先体の形態の正常性について調べた。

「胚（幼生）と外套膜の凍結保存技術の開発」では、適切な凍害防御剤の種類、濃度および凍結速度について検討した。

「凍結保存法により得られた幼生の能力評価」では、凍結精子で生産された幼生の摂餌能力や成長、生残が正常かどうか検討した。

なお本試験は、三重大学を中核機関とし、近畿大学、三重県栽培漁業センターおよび水産研究部を共同機関とする共同研究体制で実施した。本試験の詳細については別途報告書として取りまとめたので、ここではその概要について記載する。

1. 凍結保存精子による適切な人工受精方法の確立 （凍結保存精子の受精能力の検討と運動率の低下要因の解明）

方 法

小規模での人工受精において精子の受精能力を正確に測定するのに適した卵の密度は1万粒/mLであることが明らかにされている（精液量20 μ L、海水中のアンモニア濃度750 μ L/L）。そこで、アンモニア海水10mL中に卵を10万粒収容し、8段階量（精液量として40, 20, 6.66, 2.22, 0.74, 0.25, 0.082, 0.027 μ L）の凍結精子または非凍結精子（新鮮精子）を加えて媒精して、それぞれの受精率（卵割率）を求めた。

また精子の形態について、凍結精子（解凍後）と非凍結精子を定法により走査電子顕微鏡で観察し、鞭毛の損傷率と先体反応率（異常率）を測定した。

結果および考察

卵10万粒に対して8段階量の凍結精子または非凍結精子を加えて媒精した結果、2.22 μ L以上の媒精量ではともに60～70％と高い受精率を示したものの、凍結保存精子では0.74 μ L以下で徐々に低下する傾向を示した。一方、非凍結精子では0.25 μ Lまで高い値を維持し、0.082 μ L以下で低下を示した。以上の結果から、非凍結精子と同等の受精率を得るのに必要な凍結精子の媒精量は、卵10万粒に対して生精子にして2.22 μ L（卵：精子＝1:300）であり、これを下回ると凍結精子の受精能力は非凍結精子に比べて大幅に低下することが分かった。

凍結精子と非凍結精子の形態を観察したところ、鞭毛に損傷のある精子は非凍結精子では10％以下であったのに対し、凍結精子では55％であった。また先体反応を起こしていた精子は非凍結精子では数％であったのに対し、凍結精子では60％であった。鞭毛に損傷がなく先体も正常な精子は、非凍結精子では90％であったのに対し、凍結精子では15％に留まっており、凍結精子におけるこれらの異常が運動率や受精能力の低下の要因であると考えられた。

2. 胚（幼生）の凍結保存技術の開発

方 法

凍結対象としたアコヤガイ胚の発生ステージは、トロコフォラ幼生とD型幼生とした。試験に用いた凍害防御剤はDMSO、メタノール、グリセロール、ジメチルアセトアミド、エチレングリコールの5種類とし、それぞれ濾過海水で希釈して10, 15, 20％に調製した。幼生を各溶液中に10, 15, 30, 60, 120分浸漬させた後、凍結速度を0.5, 1, 1.5, 2, 5, 10 $^{\circ}$ C/分、到達温度を10, 20, 30, 35, 40 $^{\circ}$ Cの条件で凍結し、解凍後の生残率を測定した。また、各凍結条件において植水操作およびFBS（ウシ胎児血清）の保存液への添加の効果について検討した。

結果および考察

凍害防御剤の濃度を15%以上にするとDMSOとメタノール以外では、15分以内に幼生の運動が停止した。そのため、10～15%の濃度で15分浸漬し、凍結速度を1℃/分、凍結到達温度を30℃と35℃として凍結した。その結果、DMSOとメタノールで凍結した個体の約2%が外部形態の崩れた状態で生存が確認されたが、再現性が乏しかった。また12℃で植氷操作を行うことで、5%（概ね20個体中1個体）の生残が認められた。これ以外の条件では生残は見られなかった。次にこれらと同じ条件で、凍結過程において12℃で植氷を行い、この温度で10分間保ち、さらに10、15、20、40%濃度のFBS海水を調製した保存液を用いて凍結したところ、15%と20%FBS海水で希釈した10～15%のDMSOで5～50%（概ね20個体中1～10個体）の生残が認められた。

3. 外套膜の凍結保存技術の開発

方法

試験に用いた凍害防御剤はDMSO、メタノール、グリセロール、エチレングリコール、ジメチルアセトアミドとし、それらの濃度は10%とした。凍結速度は1、5、10℃/分、凍結到達温度は60℃の条件で凍結を行い、解凍した外套膜片からパラフィン切片を作成し、組織学的な観察を行った。組織の破壊損傷の程度について、目視観察により「破壊がない」、「多少の破壊が見られる」、「原型をとどめず」の3段階で評価した。また、これら5種類の凍害防御剤を使用して凍結（凍結速度：1℃/分、到達温度：30、60℃）・解凍した外套膜片を用いて、アコヤガイ母貝に挿核手術（1処理区について30個体）を行い、2ヶ月後に貝を取り上げて真珠袋の上皮細胞および真珠層の形成された個体の割合を調査した。

結果および考察

凍害防御剤別の処理区における外套膜組織の異常の出現頻度は、メタノール区が最も低く、ジメチルアセトアミド区が最も高かった。このことから、組織学的な観点からは外套膜を対象とした凍害防御剤にはメタノールが適しており、ジメチルアセトアミドは不適切であると評価された。

挿核手術を行った試験貝のうち、真珠袋の上皮細胞が形成された割合は「到達温度60℃、メタノール」区が最も高く、次いで「到達温度60℃、ジメチルアセトアミド」区であった。真珠層の形成が確認されたのは、「到達温度60℃、グリセロール」区のみであったが、これについては挿核後の期間を長期化した条件で再度確認

する必要がある。

4. 凍結保存法により得られた幼生の能力評価

方法

精子の凍結条件は、①凍害防御剤：10%メタノール、②希釈液：20%FBS+海水、③凍結速度：17.6℃/分、④到達温度：50℃とした。

試験貝には重量44～66gのアコヤガイを用い、雌雄一対交配の組合せの7組について、各雄の凍結精子と非凍結精子を用いて定法により受精させた（7組×2＝計14区）。受精1日後にふ化した幼生を飼育容器（水容量2Lビーカー）に収容し、容器を25℃に設定したウォーターバス内に設置した。試験開始時の幼生の飼育密度は3.2～18.1個体/mLで、飼育期間中に幼生の成長に応じて飼育密度を適宜調整した。試験期間は平成17年6月24日から7月15日までの22日間とした。飼育水には濾過海水を用い、餌料としてPavlova lutheri（植物プランクトン）を1日1回適量給餌した。幼生のプランクトン摂餌量は、前日の給餌量から当日の残餌量を差し引いて算出した。試験開始1、8、15、22日目に各区から30個体ずつ任意に幼生を採取して殻長を測定した。

結果および考察

試験期間中における幼生の平均摂餌量（1日1幼生あたり）は、非凍結精子区が4771細胞、凍結精子区が5655細胞で凍結精子区の方が多かった。両区とも幼生の摂餌量は正常の範囲内で推移し、凍結精子区で摂餌不能等の異常はみられなかった。また、終了時における幼生の殻長は、非凍結精子区が219.7μm、凍結精子区が216.4μmであった。幼生の摂餌量および殻長とも両区の間には有意差は認められなかった。これらのことから、凍結精子区の幼生の摂餌能力や成長は凍結精子区と同等で、正常であると評価された。試験期間中のへい死率は、非凍結精子区が26.9%、凍結精子区が18.3%で、非凍結精子区の方が高かったものの、両区の間には有意な差はなかった。幼生のへい死の原因は不明であるが、精子を凍結処理したことに起因するものではないと考えられた。

関連報文

平成17年度先端技術を活用した農林水産研究高度化事業報告書