

目 的

アユは継代が進むにつれて性成熟や最終成熟・排卵時期が同調しやすくなるが、継代数が若い、あるいは天然河川から入手した親魚では、これらの時期が雌雄・個体間でバラつきやすい。アユの種苗生産においては、通常雌親魚の排卵状況により採卵のスケジュールを決定し、それに合わせてその都度採精することが多い。そのため、場合によっては排精が確認された雄を分養し、雌が排卵するまで飼育を続ける状況となるが、雄の排精維持期間についての報告はない。また、卵数がまとまらず複数日にまたがり授精を行う際には、短期間に同一群から複数回採精を行う必要があるが、たとえば精子の運動能力や受精能力が長期間保持されるのであれば省力化が図れる。そこで本研究では、成熟した雄が排精し続ける期間、および得られた精子の保存性と受精能力について調べた。

材料および方法

**採精可能期間の検証** 試験には栃木県漁業協同組合連合会産アユ人工種苗を用いた。2016 年 9 月 28 日に排精が確認されたアユ 20 尾を 2 t 長方形水槽に移し、試験終了時まで無給餌で飼育した。試験期間中に死亡した個体はすみやかに取り出した。10 月 3 日、10 月 18 日、11 月 15 日、12 月 13 日にすべての個体の腹部を圧迫することで排精の有無を確認した。12 月 13 日に生存魚の体重および精巣重量を計測し、生殖腺体指数 (GSI) を算出した。

**精子保存可能期間の検証** 試験には上記の試験で排精が確認されたアユを用いた。水槽内で排精が確認された個体からランダムに 10 尾 (12 月 13 日は 7 尾) を選出し、生殖腔からシリンジで吸引することで採精した。精子はアユ人工精漿<sup>1)</sup>で図 1 の濃度になるまで 50 倍から 100 倍希釈し、各 4 mL ずつ 15 mL 遠沈管に分注した後、9 月 28 日は各個体別々あるいはまとめて、以降の日はまとめたもののみを 4°C で保存した。精子の運動能は、1 μL の精子希釈液を 20 μL のアユ授精液<sup>1)</sup>で希釈したものを光学顕微鏡下で観察した。運動精子比の測定は目視で行ない、運動精子比が 80%以上、60%から 80%、40%から 60%、20%から 40%、1%から 20%をそれぞれ A, B, C, D, E と評価した。また、運動精子比が 1%以下のものや、直進性が低く授精に使用できないと判断したものについては記号の右側に

「×」を記入した。

**保存精子の受精能力の検証** 試験は 10 月 4 日および 7 日に行った。成熟度調査により排卵が確認された雌から卵を作出し、当日に採精した精子と 1 日から 9 日間冷蔵保存した精子を用いて人工授精を行った。卵は 10 分間吸水させた後、0.1%タンニン酸により脱粘し、シャーレに入れて受精率あるいは発眼率を算出した。

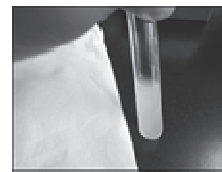


図 1 精子の保存濃度

結果および考察

9 月 28 日に得られた精子を用いて個体別の精子活性の変化を調べた (表 1)。精子活性は採精 6 時間後に比べて 24 時間後以降に徐々に増加し、個体によっては 216 時間後まで運動能力を維持した。後述の人工授精試験に用いたためこの時間までしか調べていないが、さらに長期間保存できる可能性はある。精子活性は 168 時間後以降低下する傾向がみられた。そのうち個体番号 1, 3, 5, 6, 9 では検鏡中に運動性のバクテリアが観察されたことから、その影響によるものと思われる。抗生物質を添加した人工精漿を用いることで、さらに長期間の保存が可能になるだろう。本試験では個体別の保存に加えて各個体の精子を等量ずつ混合して保存した区も設けたが、精子活性はその区で最も高く、加えて精子の運動速度が上昇し維持時間も長くなったように見受けられた。自然環境下では産卵時に雄間競争が行われるが、その際に他の雄よりも受精卵数を増加させるために、たとえば、ほかの雄の精子が存在する際に運動性を高めるような機構があるのかもしれない。

表 1 個体別の精子活性の変化

採精日	個体番号	経過時間 (h)									
		6	24	48	72	96	120	144	168	192	216
9月28日	1	D	C	D	D	D	D	C	D	E ×	
	2	D	C	C	C	C	D	B	C	C	C
	3	D	C	C	C	B	C	B	C	E ×	
	4	D	C	C	B	B	C	B	B	D	D
	5	D	C	C	C	D	D	B	C	E ×	
	6	D	D	E ×	B	C	D	C	C	E ×	
	7	D	C	D	C	C	B	B	B	C	C
	8	D	C	C	C	C	C	B	C	C	C
	9	D	C	B	B	C	C	C	E ×		
	10	C	D	D	C	D	C	C	C	C	E ×
	混合	-	B	A	A	A	B	A	B	D	E ×

混合は個体 1-10 の精子を混ぜた区を、表中のハイフンは運動性を調べていないことを示す。168 時間後以降に「×」と判断した精子は廃棄した。

続いて、同一個体の排精維持期間を調べた。その結果、ほとんどの個体が約2カ月半にわたって精子を出し続けることが明らかになった(表2)。11月15日から12月13日までに死亡数が増加したが、これは餓死によるものと考えられる。試験期間中は無給餌であり、12月に生存していた個体はやせ細っていた(図2)。これらの個体には筋肉がほとんど無く、内臓の大部分が精巢で、GSIは高いもので18%に達した(表3)。これは生存に必要なエネルギーをすべて精子形成に使用したためと考えられる。精子活性は試験後半になるにつれ悪化し保存期間も短くなったが、この時期では精子生産すらも困難になり、質の悪い精子が生産された、あるいは古い精子が残りに残っていたのかもしれない。

表2 各時期に採精した精子の運動性の変化

採精日	排精尾数 / 全尾数	採精数	経過時間 (h)												
			0	6	24	48	72	96	120	144	168	192	216		
9月28日	20 / 20	10尾	-	-	B	A	A	A	A	B	A	B	D	E	x
10月3日	18 / 19	10尾	B	-	A	A	A	A							
10月18日	19 / 19	10尾	B	-	B	B	-	B	-	C	C	x			
11月15日	16 / 17	10尾	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12月13日	7 / 7	7尾	C	B	B	C	-	-	D	x					

表中のハイフンは運動性を調べていないことを示す。「x」と判断した精子は廃棄した。10月3日の精子は96時間後にすべて人工授精に用いた。

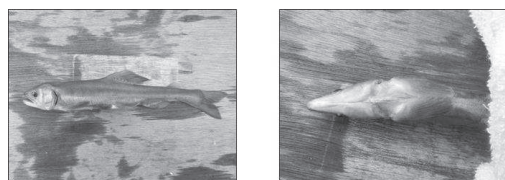


図2 試験終了時の雄の外見

表3 試験終了時の個体重量およびGSI

No	体重 (g)	GSI (%)
1	51.9	3.1
2	51.4	4.7
3	48.5	13.4
4	62.7	15.5
5	63.1	16.8
6	61.7	16.9
7	72.1	18.0

上記の保存精子を用いて受精能力の差を調べたところ、10月4日では、保存期間にかかわらず精子活性はすべて高かったが、保存精子の受精率は当日に採取した精子に比べて低かった。保存期間が0日と1日で差が大きいこと、保存精子の受精卵はシャーレでやや過密に保存したこと、受精卵の保存状態による差も大きくなったと考えられた。そこで10月7日はすべての受精卵をシャーレで保存し、正常に発生したかどうかの検証もかねて発眼率の差を調べた。その結果、保

存精子の発眼率は当日採取した精子に比べて20%以上低かった。また、保存精子の運動性の違いによる発眼率の差はみられず、精子活性と正常な発生は必ずしも関係しないことがわかった。精子形成期間中は常に新しい精子が生産されるため、採取した精子には形成後の日数の異なる精子が混在する。保存精子のうち、古いものは徐々に運動性が低下し、それが見かけ上の運動性の低下につながると考えられる。一方で新しい精子は運動性が高く、正常な受精能力を持つ。これらの中間的な精子は見かけ上は運動性があるものの、染色体等に内部的な異常があり、それが発眼率の低下につながった可能性がある。

表4 保存した精子を用いた人工授精結果

授精日	採精日	保存期間 (日)	精子活性	受精率 (%)	発眼率 (%)
10月4日	10月4日	0	A	98	-
	9月28日	6	A	49	-
	10月3日	1	A	57	-
10月7日	10月7日	0	A	-	70
	9月28日	9	D-C*	-	45
	10月3日	4	A	-	48

10月4日の保存期間0日の受精率については縦型孵化槽に収容した卵の受精率を検査した。

\*: 9月28日に採精した精子のうち、No.2, 4, 7, 8の精子活性

本試験の結果、一度排精したアユは無給餌でも長期間生存が可能であり、かつその期間は排精し続けることが明らかとなった。そのため、雄は最初に分養しておけば、雌の排卵に合わせてその都度、何度でも採精することが可能である。また、採取した精子は最長で9日間は運動性を維持し続けることが明らかになった。しかしながら、正常発生する受精卵の割合は低下する可能性が高い。そのため、実際に現場で人工授精を行う際は、多少手間がかかったとしてもその都度採精の方が望ましいと思われる。

#### 引用文献

- Ohta H, Unuma T, Tsuji M, Yoshioka M, Kashiwagi M. Effect of bicarbonate ions and pH on acquisition and maintenance of potential for motility in ayu, *Plecoglossus altivelis* Temminck et Schlegel (Osmeridae), spermatozoa. *Aquaculture Res.* 2001; 32: 385-392.

(水産研究部)