

# 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）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、これまでに凍結用保存液の組成、凍結速度、液体窒素に浸漬する到達温度の適切条件を明らかにするとともに、凍結保存した精子の受精能力を示した。本年度は、大量規模での精子の凍結保存方法を開発するため、大容量の容器を用いて凍結した精子の運動率および受精能力を調べた。

「胚（幼生）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するとともに、液体窒素に試料を直接浸漬させて瞬時に凍結を行うガラス化凍結の有効性について検討した。

「凍結保存法により得られたアコヤガイの能力評価」では、凍結精子を媒精して生産されたアコヤガイ（2年貝）の成長、生残および生理状態を調査して、貝の健全性について評価した。

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. 大量規模での精子の凍結保存技術の開発

### 方法

ストローとアルミカップを容器として大量規模で凍結・解凍したアコヤガイ精子の運動精子比と受精率を調べて、凍結保存法の有効性について検討した。ストローの容量は0.25, 1, 2 mLとし、凍結精子 100  $\mu$ L（溶液量 2 mL）を 0.25mL $\times$ 8本, 1mL $\times$ 2本, 2 mL $\times$ 1本として凍結・解凍した精子の運動精子比を求めるとともに、それらを卵 250 万粒に媒精して受精率を測定した。またアルミカップ容器では、精子 500  $\mu$ L（溶液量 10 mL）を 1 ロットとして凍結・解凍して精子の運動精子比を求めるとともに、それらを卵 1,000 万粒に媒精して受精率を測定した。

### 結果および考察

0.25, 1, 2 mL のストローを用いて凍結・解凍した精子の運動精子比は、凍結前のそれぞれ 25.7%, 22.7%,

17.0%で容量が大きいほど低下する傾向を示し、またいずれも新鮮精子区（73.0%）に比べて有意に低かった。解凍後の精子を卵 250 万粒に媒精したところ、0.25, 1, 2 mL ストロー区の受精率は 58.9%, 56.3%, 59.9%で、ストロー容量間における有意差はなく、また新鮮精子区（62.3%）との間にも有意差はなかった。

アルミカップを用いて凍結・解凍した精子の運動精子比は、凍結前の 28%で大型ストローを用いた場合の相対値と同等であった。しかし、本試験では凍結前の運動精子比が 46.7%と低かったため、凍結・解凍後の運動精子比の実測値は 13.0%と低かった。このような運動精子比の低い凍結精子を卵 1,000 万粒に媒精したところ、媒精時間が 5 分間での受精率は凍結精子区が新鮮精子区に比べて有意に低かったものの、媒精時間を 20 分以上とすることで受精率は有意に上昇し、両区の間にも有意な差はみられなくなった。

これらのことから、容量が 2 mL の大型ストローおよびアルミカップを容器としてアコヤガイ精子を大量規模で凍結保存できることが明らかとなった。

## 2. 胚（幼生）の凍結保存技術の開発

### 方法

アコヤガイ胚の凍結・解凍後の生残に及ぼす凍害保護剤の添加の影響を明らかにするため、保護剤として 20%FBS, 0.3M トレハロース, 0.3M スクロース区を設定し、凍害防御剤 10%DMSO, 凍結速度-1 /分, 植氷-12, 到達温度-35 の条件でステージの異なる胚を凍結・解凍した後の生残率を測定した。また液体窒素によるガラス化凍結法の有効性について検討した。まずガラス化凍結法に適した凍害防御剤として DMSO, プロピレングリコール, エチレングリコール+DMSO を主体とする溶液について検討した。各溶液にステージの異なる胚を浸漬させて海水に戻した後の生残率を測定した。またガラス化凍結法で凍結・解凍した後の生残率を測定した。

### 結果および考察

凍害保護剤を添加した 3 区の生残率は、いずれも無添加の 10%DMSO 区の生残率に比較して全般に低く、保護剤を用いることによる生残率の向上の効果はみられなかった。ガラス化凍結法に適した凍害防御剤について検討した結果、17.3%プロピレングリコール+11.5%メタノ

ール+60%海水が最も適していた。当該溶液に受精18時間後の幼生を浸漬した場合には、形態の損傷は認められるものの、海水に戻してから70%以上の生残率を示した。また、再現性は乏しいものの、凍結・解凍後の個体の中には正常な運動性を示す個体が認められた事例があった。

### 3. 凍結保存法により生産したアコヤガイの能力評価方法

雄個体から採取した精液を0.25ml容量のストローを用いて、凍害防御剤：10%メタノール、希釈液：20%FBS+海水、凍結速度：-17.6 /分、到達温度：-50 の条件で凍結し、解凍後に媒精して得られた幼生を育成したアコヤガイ2年貝を試験貝とした。試験区として新鮮精子区および凍結精子区とも5試験区を設定し、開始時の個体数は120個体とした。試験貝の飼育は英虞湾塩屋浦の海面養殖施設で行い、平成18年6月8日から12月8日まで184日間飼育した(平均水温23.4)。試験開始から約1ヶ月毎に平均重量を測定するとともに、へい死率を算出した。また終了時には各区から10個体ずつ採取して貝殻形態を測定するとともに閉殻筋の重量・赤色度(a値)、軟体部のグリコーゲン量・生殖巣の充

実度を評価した。

### 結果および考察

終了時の試験貝の平均重量は、凍結精子区では28.1g、新鮮精子区では29.1gで両者の間に有意差はなかった。へい死率は凍結精子区が63%、新鮮精子区が61%と全般に高かったが、両者の間に有意差はなかった。終了時に測定した試験貝の閉殻筋の赤色度は、凍結精子区が4.3、新鮮精子区が4.7で、両区間に有意差はなかったものの、いずれも赤変病の症状の目安である3.0を越えており赤変化した状態であると考えられた。このことから、試験貝のへい死の主な原因は赤変病であり、そのほかに殻体への付着生物の影響が大きいと考えられた。終了時に測定した試験貝の殻長係数等の形態を示す項目および閉殻筋・軟体部に関する生理状態を示す項目については、いずれも凍結精子区と新鮮精子区との間に有意差はみられなかった。これらのことから、凍結精子区のアコヤガイの生理的能力は新鮮精子区と同等であると考えられた。

### 関連報文

平成18年度先端技術を活用した農林水産研究高度化事業報告