

## アコヤガイの人工授精における媒精時間の違いが受精率および幼生の成長に及ぼす影響

青木秀夫・林 政博・石川 卓<sup>1</sup>・磯和 潔<sup>2</sup>・太田博巳<sup>3</sup>・古丸 明<sup>1</sup>

Influence of insemination time on fertilization rate and subsequent growth of hatched larvae of Japanese pearl oyster *Pinctada fucata martensii*

Hideo AOKI, Masahiro HAYASHI, Takashi ISHIKAWA<sup>1</sup>, Kiyoshi ISOWA<sup>2</sup>,  
Hiromi OHTA<sup>3</sup>, and Akira KOMARU<sup>4</sup>

キーワード：アコヤガイ，人工授精，媒精時間，受精率，ふ化率，幼生，成長

Effect of sperm-egg contact time on fertilization rate and growth of hatched larvae was examined in the Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*. Five million eggs obtained from a female were incubated in ammoniacal sea water (0.75 mM NH<sub>3</sub>) for 40-50 min before insemination, and then 250 μL fresh sperm obtained from a male was added (n=4). The eggs were removed from the insemination solution after contact time of 5 (ordinary time), 30, and 60 min, then fertility and hatching rate were determined. Fertilization rate of eggs increased as the contact time prolonged; fertilization rates were 55.9%, 64.2% and 68.6%, for 5, 30 and 60 min of contact time, respectively. A similar trend was also observed in the normal hatching rate 24 h after insemination. Produced larvae showed normal growth, feed intake ability, and shape, irrespective of the gamete contact times. These results suggest that prolonged exposure of spermatozoa to eggs effectively enhanced fertility and hatching rate, leading to useful technique for practical seed production.

アコヤガイ *Pinctada fucata martensii* は、わが国において真珠養殖の母貝として用いられている。現在、真珠養殖業では赤変病（黒川ら 1999, 森実ら 2001）によるアコヤガイのへい死被害の軽減や真珠品質の向上が課題となっており、その対策として選抜育種による本種の形質改良が進められている（Wada and Komaru 1996, 林 1999, 林・青木 2001, 内村ら 2005）。また、母貝用アコヤガイには、赤変病に対する耐病性が優れるとされる日本産貝と外国産貝の交雑貝の割合が増加している。こうしたことから、養殖用種苗として供給されるアコヤガイについては、現在では人工種苗が大半を占めると推察される。

アコヤガイの種苗生産では、雌雄の生殖巣を切開して得た精子および卵を用いて人工授精させる方法が確立さ

れており（林・瀬古 1986）、生産施設においては種苗の形質改良とともに、生産をより効率化するための技術開発の重要性が高まっている。人工授精を評価する指標としては、受精率（卵割率）、ふ化率および幼生の成長、形態異常率や生残率が重要であり、種苗生産の効率化を図るためにはそれらの項目について、成績の向上を目指す必要がある。

アコヤガイにおいて、生殖巣を切開して得た卵（卵母細胞）は、通常では卵核胞が消失する前の未成熟な状態（第一減数分裂前期）で、受精しない。そのため、本種の人工授精では卵をアンモニア添加海水に浸漬してアルカリ刺激を与えることで成熟分裂を促進させ、受精可能な状態とする（Wada 1961, 1963）。生殖巣を切開して得た精

<sup>1</sup> 三重大学大学院生物資源学研究所

<sup>2</sup> 三重県栽培漁業センター

<sup>3</sup> 近畿大学大学院農学研究科

子についても同様に、アルカリ処理することで運動を開始して受精可能となることが明らかにされている (Wada 1963)。

これらの知見をもとに、アコヤガイの人工授精では、一般的に生殖巣を切開して得た卵と精子をアンモニア添加海水中で受精させる。その際の媒精時間は、配偶子および受精卵に対するアンモニアの悪影響を懸念して、通常では5分間程度 (藤村ら 1995) としている。先に筆者らは、生殖巣を切開して得た精子をアンモニア添加海水 (0.75 および 2.0 mM) で希釈した後の運動率を調査し、精子は希釈後2時間以上、運動性を維持することを明らかにした (Ohta *et al.* 2007)。この結果から、本種の人工授精における媒精時間を通常 (5分間) より長時間とすることによって、受精率の向上に繋がることが期待される。特に親貝として性成熟状態が良好でない個体を使用する場合や、媒精する精子量が少ない場合には、一般に受精率は低くなることから、こうした人工授精において、受精率を向上させる技術として有効となる可能性が考えられた。

そこで本研究では、アコヤガイの人工授精において媒精時間を通常 (5分間) より長くした場合に、受精率および幼生のふ化率に向上効果がみられるかどうか検討した。また、媒精時間を長くしてふ化させた幼生の成長、形態および摂餌能力を調査し、幼生の健全性について評価した。

## 材料および方法

### 試験貝

人工授精に供する貝には、三重県栽培漁業センター (三重県志摩市) で定法 (林・瀬古 1986) により生産され、三重県英虞湾内の漁場で育成されたアコヤガイ3年貝 (日本産貝) を雌雄4個体ずつ用いた。試験貝の殻長は雌が  $75.3 \pm 1.4$  mm, 雄が  $72.8 \pm 7.2$  mm, 湿重量は雌が  $65.0 \pm 0.4$  g, 雄が  $63.7 \pm 11.0$  g であった。

### 人工授精および媒精時間

試験貝からの精液および卵の採取は切開法で行った。雌1個体から卵を約500万粒採取し、2ℓビーカー中の0.75mMアンモニア添加海水500mlに40～50分間収容して成熟を促進させた。その後、雄1個体から採取した精液250 $\mu$ lを添加し、緩やかに攪拌した。媒精時間は5分、30分、60分間の3区とした。人工授精に使用した海水は、孔径1 $\mu$ mのカートリッジフィルターによるろ過海水 (25℃に調整) とした。実験の繰り返し数は4回とした (3媒精時間  $\times$  4試験貝 = 計12区)。

### 受精率およびふ化率の測定

各媒精時間において順次、2ℓビーカーから受精卵を約110万粒 (媒精溶液110ml) ずつ採取し、そのうち10万粒 (媒精溶液10ml) については、ろ過海水で洗浄した後に、500mlビーカー (海水量500ml) に収容し、各区とも媒精開始から2時間後に定法 (青木ら 2007) により、受精率を測定した。残りの100万粒 (媒精溶液100ml) については、同様にろ過海水で洗浄した後に、30ℓ水槽 (パンライト製、海水量25ℓ) に収容し、媒精24時間後における正常なベリジャー幼生の受精卵数および全卵数 (受精卵 + 未受精卵数) に対する割合 (ふ化率) を測定した。受精卵の収容に使用した海水は上述のろ過海水とし、500mlビーカーおよび30ℓ水槽については、いずれも25℃に設定したウォーターバス内に設置した。

### 幼生の飼育

各区において、媒精24時間後に浮上したベリジャー幼生をネット (20 $\mu$ mメッシュ) で収集して、別の30ℓ水槽 (海水量25ℓ) に収容し、25℃に設定したウォーターバス内に設置して飼育を開始した (ふ化後1日目とする)。開始時における幼生の密度は、媒精5分区では  $8.5 \pm 0.8$  個体/ml, 30分区では  $8.2 \pm 1.6$  個体/ml, 60分区では  $6.1 \pm 2.0$  個体/ml であった (n=4)。飼育期間は19日間とした。飼育水にはろ過海水を用い、止水状態 (エアレーションなし) で飼育した。餌料として用いた植物プランクトンは *Pavlova lutheri* とし、1日1回午前中に給餌した。飼育開始時の給餌密度は5,000cells/mlとし、以後の給餌量は幼生の摂餌状況によって調整した。幼生による *P. lutheri* の摂餌量は、前日の給餌量から当日の残餌量 (飼育水中の現存量) を差し引いて算出した。 *P. lutheri* の数は、粒度分布測定機 (マルチサイザーⅢ, ベックマン・コールター株式会社) によって測定した。

### 幼生の成長と形態の測定

ふ化後1, 10, 19日目に各区から幼生を30個体ずつ無作為に採取し、殻長と殻高を測定するとともに、幼生の形態的特徴を示す指標として、殻長比 = [殻長 / (殻長 + 殻高)] を算出した。

### 統計学的処理

全ての測定値は平均値  $\pm$  標準誤差で示した。受精率、ふ化率、幼生の殻長、殻長比、摂餌量の各測定値については、1元配置分散分析とTukeyのHSD検定 (多重比較) により、各区の間に有意な差 (有意水準は5%) がある

かどうか検定した。なお、受精率およびふ化率については、測定値を逆正弦変換した。

## 結 果

### 受精率およびふ化率

各区の受精率およびふ化率を Table 1 に示した。受精率は、媒精5分区分では  $55.9 \pm 1.9\%$ 、30分区分では  $64.2 \pm 1.2\%$ 、60分区分では  $68.6 \pm 2.4\%$  で、媒精時間が長い区ほど高く、5分区分と60分区分の間には有意差が認められた。受精卵数に対する正常ふ化率(正常なふ化幼生数/受精卵数)は  $85.2 \sim 87.7\%$  の範囲にあり、媒精時間が長い区ほど値が低下したものの、各区の間に有意差はなかった。また全卵数に対する正常ふ化率は、5分区分では  $49.2 \pm 3.5\%$ 、30分区分では  $55.8 \pm 3.0\%$ 、60分区分では  $58.6 \pm 4.3\%$  で、受精率と同様に媒精時間が長い区ほど高かったものの、各区の間に有意差はなかった。

Table 1 Fertilization rates and normal hatching rates of the eggs produced by different insemination times.

Insemination time (min)	Fertility * <sup>1</sup> (%)	Normal hatching rate to fertilized egg * <sup>2</sup> (%)	Normal hatching rate to examined egg * <sup>3</sup> (%)
5	55.9±1.9 <sup>a</sup>	87.7±3.6	49.2±3.5
30	64.2±1.2 <sup>ab</sup>	86.9±3.7	55.8±3.0
60	68.6±2.4 <sup>b</sup>	85.2±3.9	58.6±4.3

\*<sup>1</sup> Values with different letters indicate significant difference (n=4, Tukey's HSD test,  $P < 0.05$ ).

\*<sup>2</sup> No. of hatched larvae / no. of fertilized eggs.

\*<sup>3</sup> No. of hatched larvae / no. of examined eggs.

### 成長および殻長比

幼生の殻長の測定結果を Fig.1 に示した。飼育期間中、各区において幼生に成長停滞等の異常はみられなかった。また、目視観察では各区とも水槽中にへい死個体は確認されなかった。ふ化後1日目の幼生の殻長は、媒精5分区分では  $76.3 \pm 1.1 \mu\text{m}$ 、30分区分では  $76.3 \pm 1.8 \mu\text{m}$ 、60分区分では  $74.1 \pm 1.4 \mu\text{m}$  であった。10日目の値は、5分区分では  $130.8 \pm 2.7 \mu\text{m}$ 、30分区分では  $128.7 \pm 2.5 \mu\text{m}$ 、60分区分では  $132.4 \pm 1.6 \mu\text{m}$  であり、19日目(飼育終了日)においては、5分区分では  $232.5 \pm 6.6 \mu\text{m}$ 、30分区分では  $221.7 \pm 6.9 \mu\text{m}$ 、60分区分では  $233.7 \pm 5.1 \mu\text{m}$  であった。各測定日において、幼生の殻長には各区の間に有意差はなかった。

幼生の殻長比の測定結果を Fig.2 に示した。ふ化後1日目の幼生の殻長比は、5分区分では  $52.89 \pm 0.25$ 、30分区分では  $52.91 \pm 0.27$ 、60分区分では  $52.69 \pm 0.13$  であった。その後、殻長比は各区とも低下し、10日目の値は、5分区分では  $51.45 \pm 0.15$ 、30分区分では  $51.55 \pm 0.14$ 、60分区分では  $51.48 \pm 0.14$  であった。10日目から19日目までの値は横

這いで推移した。各測定日において、幼生の殻長比には各区の間に有意差はなかった。また、形態を測定した個体において形態異常を示す個体は確認されなかった。

### 摂餌量

飼育期間中における6日間毎の幼生の摂餌量(1日1幼生あたりの摂餌量の平均値)を Fig.3 に示した。ふ化後1~6日目の摂餌量は、媒精5分区分では  $602 \pm 45 \text{ cells}$ 、30

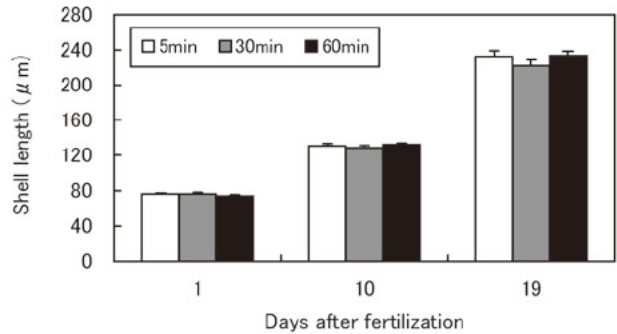


Fig.1 Growth of Japanese pearl oyster larvae produced by different insemination times. Data are shown as mean  $\pm$  SE (n = 4).

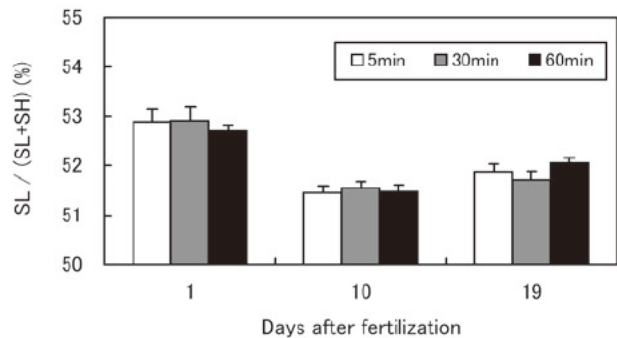


Fig.2 Shell length / (shell length+shell height) for Japanese pearl oyster larvae produced by different insemination times. Data are shown as mean  $\pm$  SE (n = 4). SL : Shell length, SH : Shell height.

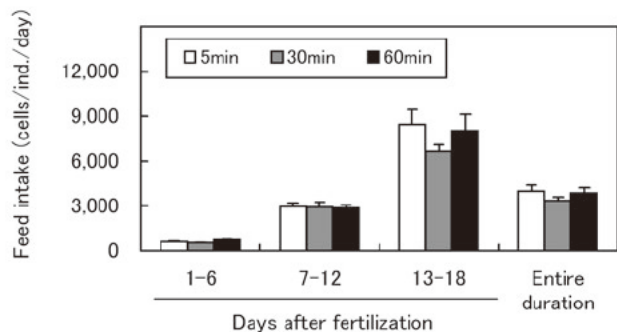


Fig.3 Estimated feed intake of Japanese pearl oyster larvae produced by different insemination times. Data are shown as mean  $\pm$  SE (n = 4).



分区では  $527 \pm 27$  cells, 60 分区では  $716 \pm 31$  cells であった。ふ化後 7～12 日目の値は、5 分区では  $2,963 \pm 243$  cells, 30 分区では  $2,931 \pm 340$  cells, 60 分区では  $2,860 \pm 192$  cells で、ふ化後 13～18 日目の値は、5 分区では  $8,438 \pm 989$  cells, 30 分区では  $6,650 \pm 445$  cells, 60 分区では  $8,031 \pm 1,084$  cells であった。各媒精時間の区とも、摂餌量は幼生の成長に伴い増加した。また飼育開始から終了までの全期間における摂餌量は、媒精 5 分区では  $4,001 \pm 400$  cells, 30 分区では  $3,369 \pm 231$  cells, 60 分区では  $3,869 \pm 356$  cells であった。各 6 日間ごとの期間および全期間において、摂餌量には各区の間に有意差はなかった。

## 考 察

本研究により、アコヤガイ人工授精における受精率は、媒精時間が長くなるほど高くなることが明らかとなった。また統計処理の結果では有意差は認められなかったものの、媒精時間を長くすることにより、正常な幼生のふ化率の上昇にも繋がる可能性が示された。受精率が高くなった要因としては、媒精時間を長くすることによって、未受精卵と運動精子の接触の機会が増えたことが考えられた。また、本研究では媒精直前における、卵核胞の消失していない未成熟卵の割合は把握していないが、媒精時間を長くすることによって成熟が進み、受精可能な状態となった卵については、その時点で運動精子と接触して受精率が高くなったことも推察される。

一方、媒精時間を長くすることにより、受精卵の発生に対するアンモニアの影響、多精、媒精溶液の溶存酸素量の低下等が懸念される。アンモニアは広く動物に対して毒性を示す物質として知られ、水生生物に対する作用が報告されている（田端 1979, 城戸ら 1991, Lin *et al.* 1993）ものの、アコヤガイの受精卵における影響は不明である。また貝類における多精受精あるいは媒精量過多に関する研究ではマガキ *Crassostrea gigas* (Stephano and Gould 1988) やアワビ類（菊池・浮 1974, Baker and Tyler 2001）において、異常発生等の悪影響が報告されている。アワビ類では媒精時間を長くした場合に、多精によって受精が阻害されることも報告されている（Grubert *et al.* 2005）。そこで、本研究において媒精 24 時間後での、受精卵数または全卵数に対する正常ふ化率、幼生の殻長および形態（殻長比）を調べたところ、それ

らには媒精時間の違いによる有意差は認められなかった。また、その後の幼生の成長、形態（殻長比）および摂餌能力についても、媒精時間による影響はみられなかった。これらのことから、本研究の条件では媒精時間が 60 分以内であれば、受精卵および幼生の生理状態に及ぼす影響は認められないと考えられる。ただし、受精卵に対する正常ふ化率については、有意差はないものの媒精時間が長いほど低く、発生に何らかの悪影響のあることも否定できないので、今後も検討する必要があると考える。

媒精時間を長くすることによる受精率の上昇効果については、配偶子の成熟状態、媒精時の精子と卵の比率、精子の運動活性およびアンモニア濃度等の要因により左右されると考えられる。本研究では、媒精 5 分後（55.9%）と 60 分後（68.6%）の間で受精率に有意差が認められた。一方、筆者らが液体窒素で凍結し、解凍したアコヤガイ精子を用いて経時的に受精率を調査した実験においては、本研究と同じ媒精比率でも、受精率は媒精 5 分後（13.9%）に比べて 20 分後（53.8%）に有意に上昇した<sup>5</sup>。凍結・解凍した精子の運動率は、凍結前の約 28% に低下しており、凍結過程でのダメージにより活性の低下した精子を用いて媒精した場合には、媒精時間を長くすることによる受精率の上昇効果が短時間で顕著に認められた。このように、精子の運動活性の低い場合や精子の数が少ない場合等、通常の 5 分間の媒精時間では受精率が低くなると推測される場合において、媒精時間を長くすることは受精率を上昇させるのに特に有効ではないかと思われた。

以上のように、アコヤガイの人工授精において媒精時間を長くすることは、受精率の上昇に有効であり、ふ化率の上昇にも寄与することが示された。また、媒精時間を長くして生産した幼生の生理状態は正常で、健全性に問題はないと評価された。したがって、本知見は本種の人工授精において受精率およびふ化率を上昇させて生産の効率化を図るために活用できるものと考えられた。今後は、アコヤガイの人工授精における受精率およびふ化率に及ぼす要因を詳細に調べ、それらの最適な媒精条件を明らかにすることが重要であると考えられる。また、種苗の健全性については、幼生段階だけでなく稚貝期以降についても評価することが望まれる。

<sup>5</sup> 青木秀夫・古丸 明・成田光好・磯和 潔・林 政博・津田悠也・太田博巳（2005）：アコヤガイ精子の大量凍結保存と解凍精子を用いた人工授精方法，日本水産増殖学会第 5 回大会講演要旨集，水産増殖 55，153-154。

## 要 約

アコヤガイの人工授精において、媒精時間を長くした場合に受精率およびふ化率が上昇するかどうか検討するとともに、媒精時間を長くして生産したベリジャー幼生の健全性について評価した。試験区として、アコヤガイの人工授精における通常の媒精時間である5分区のほか、30分区、60分区の3区を設けた。受精率および全卵数に対する正常幼生ふ化率は、媒精時間が長い区ほど高く、受精率では5分区(55.9%)と60分区(68.6%)の間に有意差が認められた。各媒精時間で生産した幼生を30ℓ水槽(海水量25ℓ, 25℃)に収容して19日間飼育し、成長、形態(殻長比)および摂餌量を調べたところ、これらの項目には各区の間に有意差はなかった。以上のことから、アコヤガイの人工授精において媒精時間を長くすることは、受精率の上昇に有効であり、ふ化した幼生の生理状態は正常で、健全性に問題はないと考えられた。

## 文 献

青木秀夫・林 政博・磯和 潔・川元貴由・太田博巳・成田光好・古丸 明(2007):凍結保存精子を用いて発生させたアコヤガイ幼生の成長、生残と摂餌能力。三重科技セ水研報, 15, 1-6.

Baker M. C. and Tyler P. A.(2001):Fertilization success in the commercial gastropod *Haliotis tuberculata*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 211, 205-213.

藤村卓也・和田浩爾・岩城俊昭(1995). アコヤガイ幼生の発生と形態: VENUS 54, 25-48.

Grubert M. A., Mundy C. N., and Ritar A. J. (2005): The effects of sperm density and gamete contact time on the fertilization success of blacklip (*Haliotis rubra*; Leach, 1814) and greenlip (*H. laevigata*; Donovan, 1808) abalone. *J. Shellfish Res.* 24, 407-413.

林 政博・瀬古慶子(1986):アコヤガイの種苗生産について。三重水技研報 1, 39-68.

林 政博(1999):アコヤガイの殻体真珠層色の改良について。全真連技術研究会報 14, 1-15.

林 政博・青木秀夫(2001):アコヤガイ母貝の選抜育種による真珠の巻きの改良について。全真連技術研究会報 15, 1-7.

城戸勝利・渡辺康憲・中村幸雄・岡村武志(1991):マダイ卵および仔稚魚の生残に及ぼすアンモニアの影響。水産増殖 39, 353-362.

菊池省吾・浮 永久(1974):アワビ属の採卵技術に関する

研究。第3報 精虫濃度と受精率の関係。東北水研報 34, 67-71.

黒川忠英・鈴木 徹・岡内正典・三輪 理・永井清仁・中村弘二・本城凡夫・中島員洋・芦田勝朗・船越将二(1999):外套膜片移植および同居飼育によるアコヤガイ *Pinctada fucata martensii* の閉殻筋の赤変化を伴う疾病の人為的感染。日水誌 65, 241-251.

Lin H. P., Thuet P., Trilles J. P., Mounet-Guillaume R., and Charmantir G. (1993): Effects of ammonia on survival and osmoregulation of various development stage of the shrimp *Penaeus japonicus*. *Mar. Biol.* 117, 591-598.

森実庸男・滝本真一・西川 智・松山紀彦・蝶野一徳・植村作治郎・藤田慶之・山下浩史・川上秀昌・小泉喜嗣・内村祐之・市川 衛(2001):愛媛県宇和海における軟体部の赤変化を伴うアコヤガイの大量へい死。魚病研究 36, 207-216.

Ohta H., Kawamoto T., Isowa K., Aoki H., Hayashi M., Narita T., and Komaru A. (2007): Motility of spermatozoa obtained from testis of the Japanese pearl oyster *Pinctada fucata martensii*. *Fish. Sci.* 73, 107-111.

Stephano J. L. and Gould M. (1988): Avoiding polyspermy in oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture* 73, 295-307.

田端健二(1979):水生生物に対する各種水質汚染物質の半数致死濃度と長期影響限界濃度との関係。東海水研報 98, 1-21.

内村祐之・西川 智・浜田耕示・兵藤勝也・広瀬琢磨・石原浩二・杉本 学・中島伸佳(2005):感染症の症状を軽減した耐病性アコヤガイ系統の開発。水産育種 34, 91-97.

Wada K. T. and Komaru A. (1996): Color and weight of pearls produced by grafting the mantle tissue from a selected population for white shell color of the Japanese pearl oyster *Pinctada fucata martensii* (Dunker). *Aquaculture* 142, 25-32.

Wada S. K. (1961): Fertilizability of *Crassostrea* and *Pinctada* eggs as related to germinal vesicle break down. *Mem Fac Fish Kagoshima Univ* 10, 1-8.

Wada S. K. (1963): Studies on the fertilization of pelecypod gametes- I. Increase in maturity and accomplishment of fertilization of pearl oyster in ammonical sea water. *Mem Fac Fish Kagoshima Univ* 12, 92-108.