

アカクラゲを用いたクラゲ類の精子保存技術確立にむけての試行

○園山貴之（下関市立しものせき水族館）

はじめに

配偶子の凍結保存は、生物を維持管理していく中で、系統の保存、飼育管理の省力化のみではなく、生物多様性の保全への関心が高まるなか、遺伝資源保存などを目的に実用化への進展が求められている。精子の凍結技術は、哺乳類、鳥類、魚類などの多くの脊索動物ですでに確立されており、無脊椎動物のマガキガイ *Crassostrea gigas* やアコヤガイ *Pinctada fucata* など水産上重要種で開発が進んでいる。精子凍結技術が確立できる種であれば、入手困難種の入手や展示も容易になることが考えられる。

哺乳類・・・ヒトや家畜ですでに実用化
鳥類・・・ペンギン類
魚類・・・1953年にニシンで
無脊椎動物・・・
マガキ *Crassostrea gigas*
アコヤガイ *Pinctada fucata*
コブミドリイシ *Acropora digitifera* など

これまで、下関市立しものせき水族館では無脊椎動物の精子凍結を試行し、アカクラゲ *Chrysaora pacifica* の精子を凍結し、保存期間1日後の精子を用いてプラヌラ幼生までの発生を確認しているが、凍結保護剤の検討や、保存可能期間の検討など、多くの課題が残っている。（2018年JACRE第一回水族館研究会）

クラゲ類の精子凍結技術確立に向けて、凍結保護剤の検討、保存期間の再検討を行った。

DMSO

- Kurokawa et al., 1990. Lesions of Spermatozoa by Cryopreservation in Oyster *Crassostrea gigas*. Nippon Suisan Gakkaishi, 56(11):1803-1806
- 宮本, 1990. マダイ及びクロダイの精子とその凍結保存について. 長崎県水産試験場研究報告, 16:21-28
- 高橋, 岡崎, 1994. ニシキゴイ精子の凍結保存について. 山梨県水産研究センター事業報告書, 22:13-19
- 土居ほか, 1994. ヒメマスの精液凍結保存技術開発試験. 栃木県水産試験場研究報告, 38:39-40
- 齊藤, 1996. ヒラメ・カレイ類精液の凍結保存 第1報 ベレット法とストロー法. 北海道立水産試験場研究報告, 48:9-17
- 今泉ほか, 2005. クエの精子凍結保存方法と凍結精子を用いた人工受精. 水産増殖, 53(4):405-411

DMA

- Warnecke et al., 2003. Motility and fertilizing capacity of frozen/thawed common carp (*Crprinus carpio* L.) sperm using dimethyl-actamide as the main cryoprotectant. Aquaculture, 215:167-185

DMF

- Aoki et al., 1997. Cryopreservation of medaka spermatozoa. Zoo.Sci., 14:641-644

グリセリン

- 川嶋, 1987. ニジマス精液の凍結, 解凍時の温度変化が精子の生機に及ぼす影響. 静岡県水産試験場研究報告, 22:61-70
- 奥村, 廣瀬, 1991. 凍結保存精子によるアカアマダイの人工受精. 水産増殖, 33(4):441-445

メタノール

- 上原, 太田, 2005. イタセンバラ精子の凍結保存. 日本水産学会誌, 71(4):578-583
- 津高ほか, 2006. アユ精子の凍結保存方法. 日本水産学会誌, 72(1):34-40
- 青木ほか, 2006. アコヤガイ精子の大量凍結保存方法の検討. 日本水産学会誌, 73(6):1049-1056
- 青木ほか, 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, 生存と摂餌能力. 三重科学技術振興センター水産研究部研究報告, 15:1-6
- Ohki et al., 2014. Cryopreservation of *Acropora digitifera* sperm with use of sucrose and methanol based solution. Elsevier Cryobiology, 69(1):134-139

材料

和名：アカクラゲ
学名：*Chrysaora pacifica* (Goette, 1886)
分類：オキクラゲ科ヤナギクラゲ属
採集日時：2022年4月28日, 5月2日, 5月23日
採集場所：下関市あるかぼーと 唐戸港



Fig. アカクラゲ



Fig. 採集地

凍結保護剤：

DMSO (ジメチルスルホキシド) CH_3SOCH_3
DMA (ジメチルアセトアミド) $\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}$
DMF (ジメチルホルムアミド) $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$
グリセリン $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$
メタノール CH_3OH



Fig. 凍結保護剤

方法：精子取り出しから人工授精



①凍結保護剤の検討

方法

常温の精子を最終濃度10%のDMSO, DMA, DMF, グリセリン, メタノールにそれぞれ入れて攪拌し、1区画の精子すべてと、運動している精子を顕微鏡下でカウントした。

また、精子を直接凍結保護剤に入れた場合と、精巣を入れた場合の比較も行った。

②凍結保護剤 (DMSO) 濃度の検討

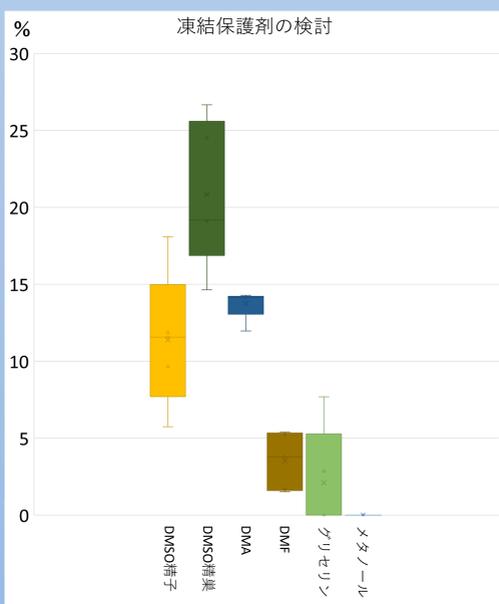
常温の精巣を濃度0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35%にそれぞれ入れ攪拌し、1区画の精子すべてと、運動している精子を顕微鏡下でカウントした。

③精子保存方法、保存期間の検討

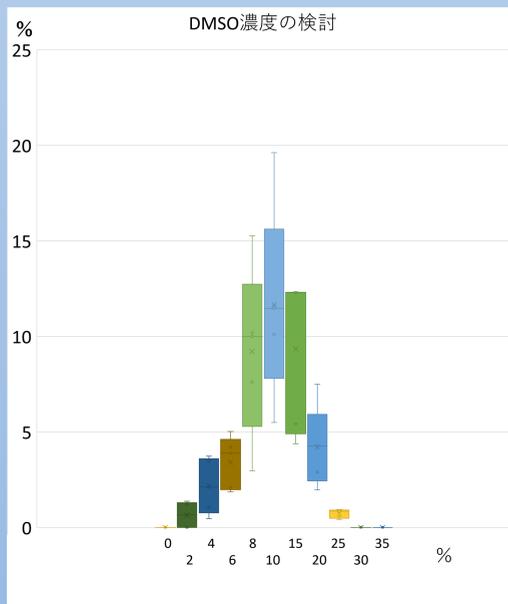
10%DMSOに入れ凍結したものと、冷蔵 (6℃) したものそれぞれを、凍結および冷蔵5日後、10日後に人工授精を行い、1区画の卵すべてと、プラヌラ幼生のを顕微鏡下でカウントした。

また、凍結および冷蔵10日後の精子について、1区画の精子すべてと、運動している精子を顕微鏡下でカウントした。

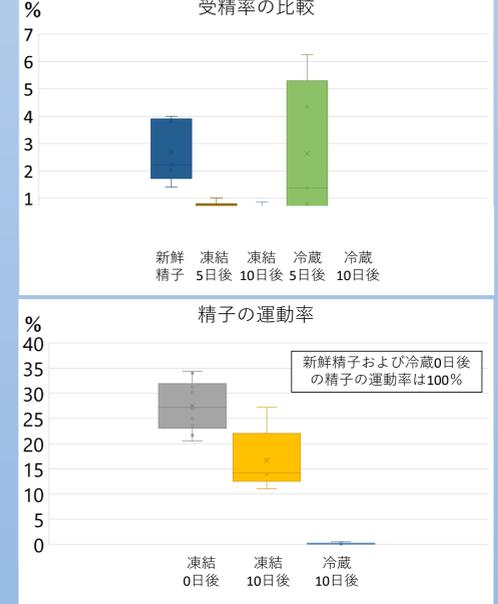
結果



凍結保護剤にはDMSOが最も適しており、取り出した精子を直接保存するよりも、**精巣ごと保存したほうが成績が良かった。**



DMSO濃度は10%が最も適していた。



個体から精巣を取り出した5日後では、冷蔵保存しておいた方が受精率が良いが、10日後では、冷蔵は受精率が著しく低下したのに対し、凍結ではわずかに低下し、運動している精子にも差が見られた。

本研究では、凍結保護剤の選定、濃度、保存期間の検討を行った。また、本研究中に作成した凍結精子を用いた人工授精によりポリプも得られた。ただし凍結5日後には受精率は1%にも満たないため、実用的とは言えず、現段階では人工授精期間を数日延長させることができる程度であるが、クラゲ類の精子凍結技術の確立により、飼育下での繁殖困難種については、野生個体への捕獲圧を減らす効果も期待できる。

謝辞：本研究にあたり、下関市立しものせき水族館魚類展示課の皆様にご協力いただきました。