



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	サケ科魚類およびブリ属魚類における産業応用に向けた精子凍結保存に関する研究
Author(s)	山下, 量平
Description	この博士論文の全文は利用可能日以降に公開されます。利用可能日以前の閲覧方法は https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/ をご参照ください。
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(水産科学)
Dissertation Number	甲第16717号
Issue Date	2026-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16717
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/99562
Type	doctoral thesis
File Information	Ryohei_Yamashita_abstract.pdf, 論文内容の要旨 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（水産科学）

氏名：山下 量平

学 位 論 文 題 目

サケ科魚類およびブリ属魚類における産業応用に向けた精子凍結保存に関する研究

日本では1984年をピークに漁業・養殖生産量は減少を続けており、養殖生産は1990年頃から横這い状態である。水産庁は水産業成長産業化総合戦略を2020年に策定し、ブリ属魚類やサケ・マスなどが戦略的養殖品目とされている。ブリ属魚類やサケ・マスについては主要な養殖対象魚種であり、大手企業による参入も見られている。特に大手企業においてはブリ (*Seriola quinqueradiata*) やギンザケ (*Oncorhynchus kisutch*) の高成長育種にも取り組んでいる。養殖生産における育種では、事故や天災などによる作出系統などの遺伝資源の消失リスクが懸念される。遺伝資源保存の有効な手段の一つに精子の凍結保存があり、ブリを含む本邦の養殖魚種を対象とした研究が多く実施されている。精子凍結保存は養殖生産における有用系統や、本邦のサケ科魚類における絶滅危惧種の遺伝資源保存に利用できるだけでなく、戻し交配や後代検定などへの利用といった育種ツールとしての応用も可能である。精子凍結保存では、解凍後に精子が高い運動性を保持する凍結条件が求められる。精子の運動性の評価は、1980年代以降にComputer-Assisted Sperm Analysisが導入されてからは、高度な定量的評価が実現可能となった。魚類の凍結精子においては、雌1個体あたりの擁卵数が多いため、受精の効率を高めるためには解凍後に多くの運動精子数を担保する必要がある。凍結精子における解凍後の精子運動性や生残率、精子濃度を複合的に評価することが重要である。魚類の場合、海産魚とサケ科魚類、淡水魚で精子の運動開始条件や運動性が異なることから最適な精子凍結保存条件も異なる。精子凍結保存条件の検討としては、凍結保護剤の種類や精液の希釈液、精液の希釈率、精液と希釈液の平衡化時間、凍結条件や解凍条件など、様々な要因が解凍後の精子の品質に影響を与えると考えられる。サケ科魚類においては、終濃度が150 mM グルコースと7.5% メタノールから構成される希釈液を凍結保護剤に用いる方法 (GM法) が開発されて以降、凍結精子の解凍後の運動性は飛躍的に向上した。これまでに複数のサケ科魚類において、精子凍結保存用ストローの容量や凍結時の精液希釈率の最適化が検討されている。ブリなどの海産魚では、ジメチルスルホキシド (DMSO) やメタノールといった精子凍結保護剤の比較や濃度検討を中心に進められており、各機関が個別に精子凍結保存方法を研究している。また、養殖生産における凍結精子の利用においては、効率的に受精卵を得るために、解凍後の運動精子数が最大となる保管条件も重要となる。そこで本研究では、サケ科魚類の精液を用い、精子凍結保存におけるストローサイズおよび精子希釈率が保存効率に及ぼす影響を、解凍後の精子運動性および生残性を指標として評価した。さらに、これらの凍結保存条件が解凍後の運動精子数および受精能力に与える影響についても検討した。ブリ属魚類においては精子凍結保存時の凍結保護剤の種類や濃度、人工精漿の種類、平衡化の有無、凍結精液の解凍方法、解凍後の静置時間の影響を、解凍後の精子の運動性を指標として評価し、産業規模における最も効率的な保管方法について考察した。

サケ科魚類では、ニジマス (*Oncorhynchus mykiss*)、アメマス (*Salvelinus leucomaenis*) およびギンザケにおいて、GM法を用いて精子凍結保存容器と精液希釈率の解凍後の精子運動性や生残性への影響を評価した。また、精子運動率と生残率から運動精子数を導き、受精への利用のための保管の効率性について検討した。ニジマスでは新鮮精

液の精子運動率は $85.2 \pm 10.4\%$ 、精子生残率は $93.3 \pm 7.8\%$ で、凍結精液の精液希釈率 3 倍では 0.25 ml および 0.5 ml の両ストローサイズにおいて運動率および生残率が大きく低下した。 0.5 ml ストローの精液希釈率 6 倍および 12 倍では解凍後の精子運動率がそれぞれ $39.7 \pm 11.2\%$ および $45.7 \pm 14.0\%$ と他の凍結精子の試験区と比べて高く、生残率も $72.8 \pm 4.8\%$ および $73.0 \pm 7.8\%$ と高かった。凍結精液の運動精子数の比較では、 0.5 ml ストローの精液希釈率 6 倍で最も多くなり、最も少ない 0.25 ml ストローの精液希釈率 3 倍と比べて約 8 倍の保存効率向上の可能性が示された。アメマスでは採精量が多く、 0.25 ml および 0.5 ml ストロー両方の検討が出来た個体においては、他の個体に比べて解凍後の精子運動率や生残率が高く、また 0.5 ml ストローでは 0.25 ml に比べて解凍後の精子運動率や生残率が高くなった。 0.5 ml ストローにおいては、精液希釈率 6 倍にて解凍後の精子運動率や生残率が最も高くなり、運動精子数の観点からも最も保管効率が高くなると考えられた。ギンザケでは 0.5 ml ストローを用いて検討し、解凍後の精子運動率は精液希釈率 6 倍の $42.4 \pm 8.7\%$ 、12 倍の $41.7 \pm 9.9\%$ に比べて、3 倍では $8.1 \pm 7.9\%$ と大きく低下した。ニジマスにおける運動精子数の算出を参考にすると、ギンザケにおいても精液希釈率 6 倍において最も運動精子数が多くなり、効率的な保管条件になると考えられた。さらに、凍結精子の受精と胚発生への影響を検証するために、精液希釈率 6 倍の凍結精子を用いて人工授精を実施した。その結果、孵化率は新鮮精液で $33.1 \pm 24.0\%$ 、凍結精液で $17.6 \pm 15.4\%$ と有意な差は見られなかったが、いずれの試験区においても既報のサケ科魚類の受精試験に比べて孵化率は低かった。受精率は同等であったことから、低い孵化率の原因には卵割後の胚発生異常などの卵質による影響が考えられた。

ブリ属魚類では、ブリ、ヒラマサ (*Seriola lalandi*)、カンパチ (*Seriola dumerili*) を対象に、凍結保護剤の種類と濃度、細胞外凍結保護剤添加、人工精漿、平衡化時間、凍結精子解凍方法、解凍後静置時間が運動性に及ぼす影響を検討した。ブリではエチレングリコール (EG) を凍結保護剤とした場合に最も解凍後の運動率が高くなった

($45.5 \pm 6.7\%$)。また平衡化は 0 分から 15 分にかけて運動率が上昇する傾向が見られた。凍結保護剤濃度では 1.6 M において最も解凍後の精子運動率が高くなった

($38.9 \pm 17.0\%$)。凍結精子の解凍条件は 40°C 、10 秒で最も解凍後の精子運動率が高かった ($69.0 \pm 5.8\%$)。また、解凍後の運動性は少なくとも 120 分程度は維持される可能性が示された。ヒラマサでは凍結保護剤として DMSO が最も高い解凍後の精子運動率

($47.0 \pm 5.9\%$) を示し、ツノガレイ (*Pleuronectes quadrituberculatus*) 人工精漿を用いて DMSO 1.3 M 、平衡化 15 分で凍結した条件では、他の条件と比較して解凍後の精子運動率が高く、解凍後の精子運動率低下が緩やかであった。また、解凍直後の精子運動率が高い条件ほど時間経過に伴う精子運動率の低下が緩やかである可能性が示された。カンパチではプロピレングリコールを凍結保護剤として用いた場合に最も高い解凍後の精子運動率 ($18.3 \pm 4.7\%$) が得られ、近縁種内でも最適凍結保護剤が魚種特異的に異なることが示された。

以上の結果より、本研究ではサケ科魚類ではストローサイズと精液希釈率の最適化により解凍後の運動精子数を最大化する効率的な保管方法を示した。ブリ属魚類では凍結保護剤、凍結保護剤濃度、人工精漿、平衡化、解凍条件の組合せ最適化により解凍後の精子運動性の向上や運動性の維持時間について、実用レベルの人工授精作業へ拡張できることを示した。これらの知見は、遺伝資源の育種における計画的交配への利用や遺伝資源損失リスクの低減に寄与する。また、魚類における精子凍結保存技術の国際基準レベルでの標準化に向けて、比較検討すべき条件を整理し、魚種横断的な最適プロトコル確立の基盤を提供するものと考えられる。