



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_summary.pdf, 全文の要約



主論文の要約

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

世界的な水産物需要の高まりに伴い、世界における養殖生産量は 1980 年代以降急激な増加を続けている。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、養殖生産については 1990 年頃から横這い状態である。水産庁は輸出拡大や国内需要喚起を目的とした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して挙げられている。日本国内におけ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、小規模経営体に留まらず、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り、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。以下に、本研究で得られた知見をまとめる。

(1) サケ科魚類における凍結精子最適化検討

サケ科魚類における最適な精子凍結保存条件を検討するために、0.25 ml または 0.5 ml を使用して GM 法における最適な精液希釈倍率を解凍後の精子運動性や生残性から評価した。第 1 節ではニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) についての検討を実施した。0.25 ml ストローおよび 0.5 ml ストローいずれにおいても精液希釈率 6 倍 (0.25 ml: 27.1±15.3%、0.5 ml: 39.7±11.2%) および 12 倍 (0.25 ml: 20.8±16.1%、0.5 ml: 45.7±14.0%) にて凍結することで、精液希釈率 3 倍 (0.25 ml: 5.3±0.5%、0.5 ml: 10.3±8.8%) に比べて解凍後の精子運動率が高くなった。また、ストローサイズ 0.25 mL に比べて 0.5 mL にてすべての精液希釈率で解凍後の精子運動率が高くなった。解凍後の精子生残率についても、0.25 ml ストローおよび 0.5 ml ストローいずれにおいても精液希釈率 6 倍 (0.25 ml: 63.0±10.1%、0.5 ml: 72.8±4.8%) および 12 倍 (0.25 ml: 56.3±14.0%、0.5 ml: 73.0±7.8%) において精液希釈率 3 倍 (0.25 ml: 41.8±5.7%、0.5 ml: 40.3±15.2%) に比べて解凍後の精子生残率が高くなった。また、精液希釈率 6 倍および 12 倍ではストローサイズ 0.25 ml に比べて 0.5 ml にて解凍後の精子生残率が高くなった。解凍後の精子運動率および生残率から、ストロー 1 本あたりの解凍後の運動精子数を評価したところ、精液希釈率 6 倍にて 0.5 ml ストローにて凍結精子を作製することで、解凍後の運動精子数が最大化する可能性が示された。また、最適条件で得られた運動精子数であれば、ストロー 3 本程度で親魚 1 腹分の排卵 (2,000~3,000 粒) すべてに対して十分媒精ができる運動精子数であると考えられた。

第 2 節ではアメマス (*Salvelinus leucomaenis*) についての検討を実施した。凍結精液についてはいずれの精液希釈率においても新鮮精液と比較して解凍後の精子生残率は有意に低下し、精液希釈率 3 倍、6 倍および 12 倍では精子生残率はそれぞれ 46.4±10.9%、53.8±10.5% および 47.8±7.0% であった。供試個体 6 個体のうち、他の個体に比べて著しく精液量の多かった個体については 0.25 ml ストローに加えて、0.5 ml ストローでの精子

凍結も実施した。当該個体の凍結精液では 0.25 mI ストローの精液希釈率 3 倍、6 倍および 12 倍ではそれぞれ $54.4 \pm 1.5\%$ 、 $64.3 \pm 1.8\%$ および $56.2 \pm 2.3\%$ であり、他の個体と比べて最も精子生残率が高くなった。さらに、0.5 mI ストローの精液希釈率 3 倍、6 倍および 12 倍ではそれぞれ $61.1 \pm 0.7\%$ 、 $68.4 \pm 0.4\%$ および $58.9 \pm 0.8\%$ であり、0.25 mI ストローと 0.5 mI ストローの比較では、0.5 mI ストローにおいてすべての精液希釈率で精子生残率が高くなった。精子運動率については、新鮮精液の精子運動率は $36.1 \pm 16.8\%$ であった。

凍結精液では精液希釈率 3 倍、6 倍および 12 倍において、それぞれ $7.9 \pm 9.5\%$ 、 $9.0 \pm 13.5\%$ および $4.2 \pm 5.3\%$ であり、新鮮精液に比べて精子運動率が低下する傾向が見られた。凍結精液において精子生残率が最も高かった個体については、ストローサイズ 0.25 mI では精液希釈率 3 倍、6 倍および 12 倍の精子運動率はそれぞれ $19.9 \pm 5.4\%$ 、 $20.1 \pm 4.1\%$ および $6.0 \pm 2.2\%$ であった。さらに、ストローサイズ 0.5 mI では精液希釈率 3 倍、6 倍および 12 倍の精子運動率はそれぞれ $23.0 \pm 4.3\%$ 、 $35.2 \pm 11.2\%$ および $15.3 \pm 1.9\%$ であった。当該個体では他の個体に比べて、解凍後の精子運動率が高かった。さらに、ストローサイズ間の比較では、すべての精液希釈率において 0.5 mI ストローにおいて 0.25 mI ストローを用いた場合よりも精子運動率が高くなった。また、0.5 mI ストローにおいては解凍後の精子生残率や運動性が高いことから、解凍後の運動精子数も 0.25 mI と比較して多くなるものと想定され、ストロー 1 本あたりの受精に寄与できる運動精子数が多くなることから、実用面においてもより効率的な保管技術になると考えられる。凍結精液において解凍後の精子生残率や運動率の最も高かった個体については繁殖適期にあった可能性があり、他の個体については精子生残率および精子運動率ともに低い傾向が見られ、繁殖適期を逸しており採精時期が不適であった可能性が考えられた。アメマスにおいては、採精量の多かった 1 例ではあるが、アメマス精子凍結保存において GM 法が有用である可能性が示され、精液

希釈率 6 倍にて 0.5 ml ストローを用いることで解凍後の精子生残率や精子運動率が高くなることが示唆された。また、GM 法を用いた精液凍結保存においては精液の品質の高い繁殖適期の個体を用いることが重要である可能性も示された。

第 3 節ではギンザケについての検討を実施した。ストローサイズについては、これまでのニジマス、アメマスの検討から保管効率の高さが確認されていた 0.5 ml ストローを使用した。凍結精液の解凍後の精子運動率については、精液希釈率 6 倍 ($42.4 \pm 8.7\%$) および 12 倍 ($41.7 \pm 9.9\%$) において、精液希釈率 3 倍 ($8.1 \pm 7.9\%$) よりも高くなる傾向が見られ、解凍後の精子運動率から評価した最適な精子凍結条件は精液希釈率 6 倍または 12 倍と考えられた。解凍後の精子生残率についても両精液希釈率において同等であると仮定すると、6 倍希釈ではストロー 1 本あたりの精子濃度が約 2 倍と考えられるため、精液希釈率 6 倍では解凍後の運動精子数も約 2 倍となり、最も保管効率が高くなると推察される。また、ギンザケにおいては凍結精子の受精と胚発生への影響についても評価した。精液希釈率 6 倍の凍結精液を用いて受精した結果、受精率は 100% で新鮮精液と同じであった。また、孵化率については新鮮精液 ($33.1 \pm 24.0\%$) で凍結精液 ($17.6 \pm 15.4\%$) よりも高い傾向が見られたが、有意な差は見られなかった。凍結精液についても新鮮精液同様に、人工授精への利用が可能であると考えられた。一方で、新鮮精液および凍結精液ともに受精率が 100% であったが孵化率は大きく低下した。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。

(2) ブリ属魚類における凍結精子最適化検討

ブリ属魚類における解凍後の精子運動活性の最大化を目的として、ブリ、ヒラマサ (*Seriola lalandi*) およびカンパチ (*Seriola dumerili*) を用いてブリ属魚類精子凍結保存

における各種凍結条件（凍結保護剤の種類、凍結前の平衡化、凍結保護剤濃度、細胞外凍結保護剤の併用、凍結精液解凍方法、凍結精液解凍後の静置時間）の最適化を実施した。凍結保護剤としては、GM 法その他、DMSO、エチレングリコール（EG）、プロピレングリコール（PG）およびグリセロールを用いた。

まずは、ブリにおいて凍結保護剤種類の比較、平衡化時間の影響評価、凍結保護剤濃度の影響評価、細胞外凍結保護剤の影響評価、凍結精液解凍条件の影響評価、凍結精液解凍後の運動活性推移評価を実施した。凍結保護剤の種類においては、EG において他の凍結保護剤と比較して有意に解凍後の精子運動率が高くなった（ $45.5 \pm 6.7\%$ ）。次いで PG が他の凍結保護剤に比べて解凍後の精子運動率が高くなった（ $28.0 \pm 2.6\%$ ）。平衡化時間の影響評価においては、解凍後の精子運動率の高かった凍結保護剤である EG または PG において精液凍結前の平衡化時間 0 分、5 分または 15 分にて検討した。凍結精液間の比較では、EG 区および PG 区ともに平衡化時間が長くなるにしたがって、解凍後の精子運動率が高くなる傾向が見られた（EG 区：0 分： $22.9 \pm 1.8\%$ 、5 分： $29.2 \pm 1.8\%$ 、15 分： $37.1 \pm 12.3\%$ 、PG 区：0 分： $22.1 \pm 5.4\%$ 、5 分： $26.8 \pm 6.3\%$ 、15 分： $27.9 \pm 12.5\%$ ）。凍結保護剤濃度の影響評価では、EG または PG において、凍結保護剤濃度 0.8 M、1.3 M、または 1.6 M における解凍後の精子運動性を評価した。EG 区では、1.6 M（ $38.9 \pm 17.0\%$ ）において他の凍結保護剤濃度に比べて有意に解凍後の精子運動率が高かった。また、PG 区においては 1.3 M（ $20.8 \pm 3.9\%$ ）において他の凍結保護剤濃度に比べて最も高い傾向にあった。EG 区 1.6 M および PG 区 1.3 M の間では有意な違いは見られなかった。細胞外凍結保護剤の精子運動性への影響では、EG（1.6 M）または PG（1.3 M）の細胞内凍結保護剤のみを用いた凍結精液および細胞内凍結保護剤に 50 mM または 150 mM のグルコースまたはトレハロースを細胞外凍結保護剤として添加した凍結精液の精子運動性への影響を評価した。EG 区

では、EG のみを凍結保護剤として用いた場合 ($55.8 \pm 12.0\%$) および細胞外保護剤としてトレハロースを添加した場合 (50 mM : $46.4 \pm 12.4\%$ 、150 mM : $46.0 \pm 5.7\%$) に、細胞外凍結保護剤としてグルコースを添加した場合 (50 mM : $13.6 \pm 6.6\%$ 、150 mM : $0.4 \pm 0.2\%$) と比較して、解凍後の精子運動率が高くなる傾向が見られた。EG のみとトレハロース添加の比較では、EG のみで解凍後の精子運動率が高くなる傾向が見られた。PG 区については、PG のみを凍結保護剤として用いた場合 ($48.3 \pm 8.3\%$) に最も解凍後の精子運動率が高くなる傾向が見られた。細胞外凍結保護剤を添加した試験区では、トレハロース 50 mM を添加した場合 ($18.0 \pm 10.8\%$) に他の試験区よりも解凍後の精子運動率が高くなる傾向が見られた。本研究のブリにおいては本種特有の現象として最適な細胞内保護剤のみを用いることが最も精液凍結の効率性が高い可能性が考えられた。凍結精液解凍方法の精子運動性への影響評価では、EG (1.6 M) または PG (1.3 M) を凍結保護剤として用いて各解凍方法 (20°C15 秒、20°C30 秒、20°C60 秒、40°C5 秒、40°C10 秒、40°C20 秒) にて解凍した凍結精液の精子運動性を評価した。EG 区内では 40°C10 秒 ($69.0 \pm 5.8\%$) および 40°C20 秒 ($68.9 \pm 3.1\%$) で他と比べて高い傾向が見られたが有意差は無かった。PG 区内においては、20°C60 秒 ($46.0 \pm 0.9\%$) が他よりも高い傾向が見られたが、すべての試験区では EG 区 40°C10 秒の解凍方法よりも有意に低くなった。最後に、凍結精液解凍後の運動活性推移について評価した。凍結保護剤として EG (1.6 M) または PG (1.3 M) を用いた凍結精子の各解凍時間後 (0 分、5 分、10 分、15 分、30 分、60 分および 120 分) の精子運動性を評価した。EG 区では、解凍後 0 分 ($50.5 \pm 9.0\%$) および 10 分 ($47.4 \pm 3.1\%$) では EG 区の他の試験区と比較して精子運動率が高くなる傾向が見られ、また解凍後 15 分 ($40.0 \pm 5.7\%$) 以降、精子運動率が低下していく傾向が見られたが、試験区間で有意な差は確認されなかった。一方で、PG 区では解凍後 15 分 ($23.9 \pm 23.6\%$) 以降、精子運動率が著し

く低下し、解凍後 30 分 ($2.1 \pm 0.2\%$)、60 分 ($3.9 \pm 1.2\%$) および 120 分 ($0.8 \pm 0.4\%$) では解凍後 0 分 ($31.3 \pm 8.6\%$)、5 分 ($36.2 \pm 7.1\%$) および 10 分 ($37.4 \pm 5.6\%$) と比較して精子運動率は有意に低下した。PG 区の解凍後時間 30 分以降の試験区は EG 区のすべての試験区と比較して精子運動率が有意に低かった。

次に、ヒラマサにおいて凍結保護剤種類の比較、凍結保護剤濃度の影響評価、人工精漿種類と平衡化時間の精子運動性への影響評価、凍結精液解凍後の運動活性推移評価（ツノガレイ (*Pleuronectes quadrituberculatus*) 人工精漿における凍結保護剤の影響評価) を実施した。凍結保護剤種類の比較においては、DMSO の精子運動率が最も高く ($47.0 \pm 5.9\%$)、次いで PG ($42.9 \pm 4.2\%$) が高くなった。凍結保護剤濃度の影響評価では、DMSO または PG を用いた凍結精液の凍結保護剤濃度ごとの解凍後の精子運動性を評価した。DMSO 区では 0.8 M ($25.8 \pm 6.6\%$) および 1.6 M ($22.3 \pm 10.5\%$) では 1.3 M ($53.5 \pm 5.4\%$) よりも解凍後の精子運動率が有意に低下した。また PG 区でも 1.3 M ($35.6 \pm 18.5\%$) に比べて 0.8 M ($24.6 \pm 4.2\%$) および 1.6 M ($14.8 \pm 9.7\%$) で精子運動率が低くなる傾向が見られたが、有意な差は確認されなかった。DMSO 区および PG 区間の比較では、DMSO 1.3 M の方が PG 1.3 M よりも高くなる傾向が見られたが、有意な差は見られなかった。本研究と同様に凍結保護剤の最適濃度を検討した研究では、広く魚種横断的に各凍結保護剤に特異的な最適濃度が存在する可能性が示されている。人工精漿種類と平衡化時間の精子運動性への影響評価では、凍結保護剤として DMSO を使用し、人工精漿としてツノガレイ人工精漿またはクロダイ (*Acanthopagrus schlegelii*) 人工精漿を用いた凍結精液の平衡化時間 (0 分、5 分または 15 分) ごとの解凍後の精子運動性を評価した。凍結精液間の比較では、クロダイ人工精漿を使用した場合 (平衡化時間 0 分 : $37.1 \pm 0.8\%$ 、5 分 : $34.5 \pm 21.8\%$ 、15 分 : $29.0 \pm 12.1\%$) よりもツノガレイ人工精漿を使用した場合 (平衡化時間 0 分 : 51.2

±11.8%、5 分：54.7±12.8%、15 分：58.9±13.2%）に、すべての平衡化時間において解凍後の精子運動率が高くなる傾向が見られた。また、ツノガレイ人工精漿を使用して、平衡化時間 15 分の場合、次いで平衡化時間 5 分の場合に解凍後の精子運動率が高くなり、クロダイ人工精漿を用いた平衡化時間 5 分および 15 分の試験区よりも精子運動率は有意に高くなった。同一の凍結保護剤を使用した場合でも、人工精漿の違いによって平衡化による解凍後の精子運動率への影響が異なる可能性が示された。最後に、凍結精液解凍後の運動活性推移評価（ツノガレイ人工精漿における凍結保護剤の影響評価）では、ツノガレイ人工精漿を用いた場合の凍結保護剤 DMSO または PG ごとの解凍後の精子運動活性推移（解凍後 0 分、30 分および 90 分）を評価した。DMSO 区（解凍後時間 0 分：47.1±10.3%、30 分：43.1±14.9%、90 分：33.1±14.3%）において、PG 区（解凍後時間 0 分：30.2±16.7%、30 分：24.0±19.2%、90 分：7.5±5.4%）と比較して精子運動率が高い傾向にあり、DMSO 区解凍後 0 分および 30 分は PG 区解凍後 90 分よりも精子運動率が有意に高かった。また、DMSO 区では解凍後の時間経過に伴う精子運動率の低下が PG 区に比べて緩やかな傾向が見られた。精子凍結保存に最適な凍結保護剤や保護剤濃度に加え、人工精漿を最適化することで時間経過後の精子運動率の低下も緩やかに進行し、計画的交配への利用汎用性が高まる可能性が考えられた。

最後に、凍結保護剤に種特異性が認められたため、カンパチでは凍結保護剤の比較検討を行った。凍結保護剤に PG を用いた試験区で解凍後の精子運動率が最も高く（18.3±4.7%）、EG（11.9±0.6%）以外の凍結保護剤を用いた凍結精液よりも精子運動率は有意に高くなった。近縁種でも精子凍結保存における最適な凍結保護剤が異なることについては、精子頭部の大きさや形状といった精子の形態やミトコンドリアの数や配置が近縁種間でも異なるため、種ごとに適した凍結保護剤が存在する可能性が示されている。

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、遺伝資源の育種置ける計画的交配への利用や絶滅危惧種などの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。本研究が凍結精子を遺伝資源や育種素材として保管する価値をより高める一助になったと想定される。精子凍結保存技術が生存個体に対するバックアップとしての保管扱いから、遺伝資源や育種素材の重要ツールとして、保管システムの充実も今後必要になると考えられる。