

原著論文

超低温フリーザーを用いた ブリ精子の長期凍結保存

嶋田幸典*1,*3・泉田大介*1・柴田季子*1,*4・小田憲太朗*2,*3

Long Term Cryopreservation of *Seriola quinqueradiata* sperm using an ultra-deep freezer

Yukinori SHIMADA, Daisuke IZUMIDA, Kiko SHIBATA and Kentaro ODA

We attempted to store the cryopreserved sperm in *Seriola quinqueradiata* in an ultra-deep freezer (-150°C) for a maximum of five years without using liquid nitrogen. Annual averages of the sperm motility post-thawing over a period of 5 years varied from $50.7 \pm 11.3\%$ (mean \pm S.D.) to $54.9 \pm 11.6\%$, and were not significantly different among cryopreserved periods ($p > 0.05$). Because the ultra-deep freezers can store a large amount of cryopreserved sperm (maximum 960 centrifuged tubes of 50mL size), in the future it expects to be available into industrial utilization of cryopreserved sperms with genetic improved males.

キーワード：超低温フリーザー, ブリ, 精子, 凍結保存
2025年6月9日受付 2025年9月22日受理

農林水産省（2020（2021改訂），2021）では養殖業成長産業化総合戦略およびみどりの食料システム戦略を策定し，高い成長率や耐病性といった優良形質を備えた種苗を作出するための育種研究を推進するとともに，養殖対象魚種の人工種苗生産技術の更なる高度化により，2050年までにニホンウナギ *Anguilla japonica*，クロマグロ *Thunnus orientalis*，ブリ *Seriola quinqueradiata*，カンパチ *Seriola dumerili* 等の養殖において人工種苗比率 100% を実現することを目標としている。また，水産庁（2023）では水産分野における優良系統の保護等に関するガイドラ

インを公表し，我が国の水産分野でも優良系統保護に関する議論が始められ，優良系統を開発するための下地が整備されつつある。さらに，育種産物の普及や保存の観点からは，今後，優良系統の精子を長期間にわたって利用できる凍結保存した精子（以下，凍結精子）の活用が進むと予想される。

水産分野では 1950 年代から凍結精子の作製に関する研究が開始され，現在では多くの魚種で凍結精子が作製されるようになった（Suquet *et al.* 2000, Cabrita *et al.* 2010）。本研究の対象種であるブリにおいても凍結精子

-
- *1 国立研究開発法人水産研究・教育機構水産技術研究所養殖部門育種部
〒879-2602 大分県佐伯市上浦大字津井浦
Breeding Genetics Division, Aquaculture Research Department, Fisheries Technology Institute, Japan Fisheries Research and Education Agency, Ooaza-Tsuiura, Kamiura, Saiki, Oita 879-2602, Japan
E-mail: shimada_yukinori43@fra.go.jp
- *2 国立研究開発法人水産研究・教育機構開発調査センター
- *3 現所属 国立研究開発法人水産研究・教育機構本部研究戦略部
- *4 現所属 国立研究開発法人水産研究・教育機構水産技術研究所養殖部門生産技術部

を作製できるようになっている (Shimada *et al.* 2014)。一般に、魚類精子は、採取した精液を人工精漿で希釈し、凍結保護剤 (ジメチルスルホキシド (DMSO)、エチレングリコールやグリセロールなど) と混合した溶液を作製し、液体窒素またはドライアイスによる一次凍結の後、液体窒素を用いて半永久的に凍結保存することができる。一方、液体窒素による長期保存は、液体窒素タンクを搭載した機械制御システムを導入しない限り、定期的な液体窒素の補充など長期的には多くの手間がかかる作業である。また、養殖場においては交通機関が発達していない地域があり、コストや労力の面から液体窒素を容易に入手できない場合がある。

動物細胞の凍結保存では、氷晶が形成される不安定な温度帯 (-38°C から -137°C) を回避することが重要とされている (Akiyama *et al.* 2019)。また、液体窒素は氷晶を形成しない安定的な温度 (-196°C) であるため、長期間にわたり動物細胞を凍結保存できる。著者らは氷晶を形成しないガラス化転移温度 (-137°C) に着目することで、液体窒素を使用しない長期保存方法を開発できると考えた。そこで本研究では、ガラス化転移温度より低い温度を維持可能な超低温フリーザー (-150°C) を導入して、ブリ凍結精子の長期保存を試みたので報告する。

材料および方法

ブリ精子の採取 ブリ精子は 2019 年から 2023 年の 5 年間にわたり、計 86 個体 (うち凍結精子は 79 個体) の雄親魚から採取した。2019 年から 2021 年までの雄親魚はモジャコ漁で漁獲された天然魚、2022 年から 2023 年の雄親魚は人工種苗に由来した。これらの雄親魚は漁獲または種苗生産後に民間養殖場もしくは水産研究・教育機構五島庁舎 (以下、五島庁舎) で育成された後、五島庁舎で親魚養成を行った。凍結精子は 2019 年から 2023 年にわたり満 3 歳の 4 月に、凍結せずに短時間冷蔵または氷冷で維持した新鮮な精子 (以下、新鮮精子) は 2023 年 8 月にヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG; 300~500IU/kg, あすかアニマルヘルス社製、動物用ゴナドトロピン 3000) を投与し、2 日後に腹部圧搾により精子を採取した。

ブリ精子の凍結保存 採取された精子は直ちに氷冷または冷蔵庫で保存し、可能な限り早急に一次凍結を行った。五島庁舎で一次凍結を行った凍結精子はドライシッパーで保存し、3 日以内に水産研究・教育機構の上浦庁舎 (以下、上浦庁舎) に輸送し、超低温フリーザー (-150°C; PHC 社製, MDF-C2156VA) で 1 から 5 年間にわたり保存した。精子の一次凍結は Shimada *et al.* (2014) で報告された方法を一部改変して行った。ブリ精子を希釈するための人工精漿は、スズキ目魚類 *Perciformes* で利用できる人工精漿を用い (藤浪ら 2003), 凍結保護剤は DMSO

を使用した。凍結精子のための精子懸濁液は、ブリ精子: DMSO: 人工精漿を 1:1:8 の組成とした (新鮮精子を 10 倍希釈)。一次凍結は電動ドリルでくぼみを作ったドライアイスに 300 μ L の精子懸濁液を滴下し、ペレット状の凍結精子を作製した。それらの凍結精子は雄親魚ごとに 50mL の遠沈管に収容した。それぞれの遠沈管は輸送後に 16 本入りのフリーズボックスに収容し、超低温フリーザーで長期保存した (図 1)。



図 1. 一次凍結から長期保存までの工程

運動性評価のためのブリ精子の調整 精子の運動性評価にあたり、凍結精子を準備した。新鮮精子は五島庁舎で親魚養成された 7 個体の雄親魚から採取し、運動性を評価した。なお、新鮮精子と凍結精子で測定時の濃度を調整するため、新鮮精子は人工精漿で 100 倍に希釈した。

次に、ペレット状に凍結した精子は、超低温フリーザーから取り出した直後に、ペレットの 10 倍希釈に相当する 2.7mL の人工精漿を加えた 5mL チューブに入れ、10 秒程度の転倒混和により急速解凍した (新鮮精子に対して 100 倍希釈に相当)。その後、精子の運動性評価まで氷冷または 4°C で保存した。

ブリ精子の運動性評価 ブリ精子の運動性評価には、精子運動解析装置 (DITECT 社製, SMAS) を用いた。運動性評価には精子懸濁液 10 μ L をペレット重量に応じて 490 μ L (50 倍希釈) の 1% ウシ血清アルブミン (BSA) / 海水を加えて精子を賦活化させ、高撥水性印刷スライドガラス (松浪硝子工業社製, 2 穴 15mm ϕ , TF0215) に精子懸濁液 6 μ L を加え、カバーガラス (松浪硝子工業社製, 18 \times 18mm) をして、上記の装置を用いて精子運動率を測定した。

次に、ブリ精子の運動性を評価する賦活化後の時間を調べるために、新鮮精子を用いてブリ精子の賦活化後 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 7 分の精子運動率を測定した。凍結精子は 2024 年 (2019~2023 年度の 5 年分) に解凍し、精子運動率を測定した。なお、凍結精子は上記の結果を

踏まえて賦活化後1分で運動性を評価した。

統計解析 精子の運動性評価にあたり、賦活化後の時間および精子運動率について一元配置の分散分析を行った。また、賦活化後の各時間における精子運動率についてはTukeyの多重分析を行った。さらに、凍結精子の保存性を評価するため、凍結精子の作製年度および精子運動率について一元配置の分散分析を行った。

結果

ブリ新鮮精子は賦活化後0.5から3分まで $96.9 \pm 1.1\%$ から $92.1 \pm 3.8\%$ （平均値 \pm 標準偏差、以下同様）と高い運動率を示したが（Tukeyの多重分析； $p > 0.05$ ）、4分以降では有意に運動率が低下した（一元配置の分散分析； $p < 0.001$ ，Tukeyの多重分析； $p < 0.05$ ，図2）。賦活化後1分は運動率が高く、かつ測定までの工程を行うのに十分な時間があったことから、賦活化後1分をブリの精子運動率を評価するための時間とした。なお、ブリの新鮮精子は賦活化後1分で $96.4 \pm 1.5\%$ の高い運動率を示した。

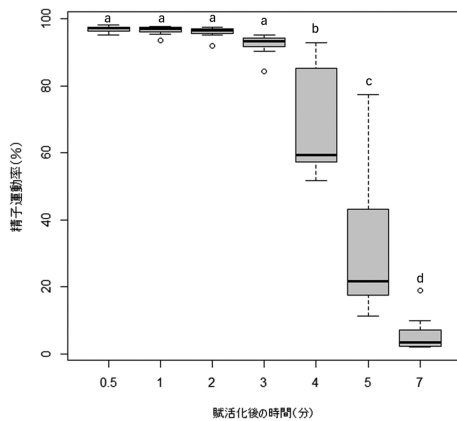


図2. ブリ新鮮精子における賦活化後の時間による精子運動率の変化
異なるアルファベットは有意差（ $p < 0.05$ ）を示す

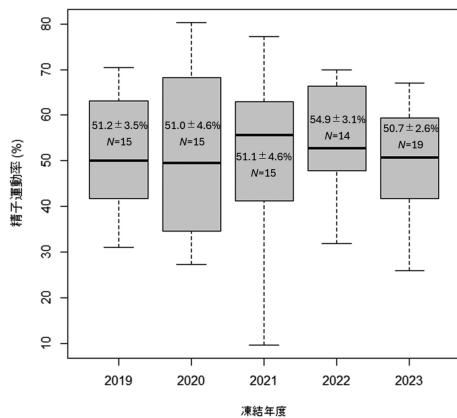


図3. 異なる凍結年度の精子運動率
凍結保存期間は2023年度の1年間から2019年度の5年間

次に、2019年（5年間保存）から2023年（1年間保存）に作製した凍結精子の運動率を図3に示した。各年度の運動率は2023年度の $50.7 \pm 11.3\%$ から2022年度の $54.9 \pm 11.6\%$ の範囲で、各年度の運動率に有意な違いは認められなかった（一元配置の分散分析； $p = 0.931$ ）。

考察

本研究は -150°C の超低温フリーザーを用いて、少なくとも5年間にわたりブリ凍結精子を保存可能であることを明らかにした。また、筆者らは一部の凍結精子について2022年にも、本研究で報告した精子運動率の結果と大きな違いがないことを確認している。細胞を安定して凍結保存するには、細胞膜や細胞小器官の破壊に起因する氷晶生成を回避することが重要である。氷晶は均質核生成温度（ -38°C ）からガラス化転移温度（ -137°C ）の範囲で生成され、これらの温度帯は熱力学的に不安定とされる（Debenedetti and Stanley 2003）。一方、細胞は急速にガラス化転移温度より低い温度（ガラス化）に移行することで、凍結保護剤がなくとも安定的に保存可能である（Akiyama *et al.* 2019）。このことから、本研究で超低温フリーザーにより凍結精子が保存できている理由は、 -150°C という保存温度が精子の細胞内の氷結晶化を防ぎ、液体窒素と同様に半永久的に安定して細胞を保存できるガラス化が維持されたためと考えられた。なお、上浦庁舎では超低温フリーザーを2台保有し、かつ自家発電装置を組み込むことで、凍結精子を安定的に保存することを試みている。今回報告した5年間においても、台風に起因する一時的な電源喪失により、庫内温度が一時的に -130°C まで上昇するを経験したが、凍結精子の活性が著しく低下するなどの大きな問題には至らなかった。

本研究は自家発電装置等の安定した電気設備を確保できれば、超低温フリーザーによるブリ凍結精子の長期保存が可能であることを示している。また、本研究で用いたPHC社製のMDF-C2156VAは有効内容積が231Lであり、50mL遠沈管を1箱で16本収納可能なフリーザーボックスやそれらを4段収納できるアルミ棚を組み合わせることで、最大で50mL遠沈管を960本収納可能である。このように大容量で凍結精子を保存可能になったことで、育種改良したブリの凍結精子の普及など、今後、凍結精子の産業利用（細谷ら 2015）に貢献すると期待している。

謝辞

本研究は水産研究・教育機構開発調査センターで実施する海洋水産資源開発事業「ブリ優良人工種苗周年供給システムの構築」で行った。精子の採取や運動解析にあたり水産研究・教育機構五島庁舎や上浦庁舎の皆さまの協力を深く感謝する。

文 献

- Akiyama Y, Shinose M, Watanabe H, Yamada S, Kanda Y (2019) Cryoprotectant-free cryopreservation of mammalian cells by superflash freezing. *PNAS*, **116**, 7738–7743.
- Cabrera E, Sarasquete C, Martínez-Páramo S, Robles V, Beirão J, Pérez-Cereales S, Herráez MP (2010) Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. *J. Appl. Ichthyol.*, **26**, 623–635.
- DeBenedetti PG, Stanlery HE (2003) Supercooled and glassy water. *Physics Today*, **56**, 40–46.
- 藤浪祐一郎・竹内宏行・津崎龍雄・太田博巳 (2003) アカアマダイ漁獲鮮魚から採取した精巢精子の運動活性と冷蔵保存. 日水誌, **69**, 162–169.
- 細谷将・水野直樹・城 夕香・藤田真志・鈴木 讓・菊池 潔 (2015) トラフグ凍結精子の家庭用冷蔵庫での二次保存. 水産技術, **7**, 85–88.
- 農林水産省 (2020 (2021改訂)) 養殖業成長産業化総合戦略. https://www.jfa.maff.go.jp/j/saibai/yousyoku/attach/pdf/seityou_senryaku-4.pdf, 2025年5月29日.
- 農林水産省 (2021) みどりの食料システム戦略～食料・農林水産業の生産力向上と持続性の両立をイノベーションで実現～. <https://www.maff.go.jp/j/kanbo/kankyo/seisaku/midori/attach/pdf/index-10.pdf>, 2025年5月29日.
- Shimada Y, Okamoto H, Nagoya H, Yamaguchi T (2014) Assessment of fertilization ability of cryopreserved sperm in fish using interspecific hybridization. *NOAA Technical Memorandum NMFS-F/SPO-168*, 45–49.
- 水産庁 (2023) 水産分野における優良系統の保護等に関するガイドライン. <https://www.jfa.maff.go.jp/j/saibai/yousyoku/attach/pdf/yuuryou-61.pdf>, 2025年5月29日.
- Suquet M, Dreanno C, Fauvel C, Cosson J, Billard R (2000) Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquac. Res.*, **31**, 231–243.