

琉球在来豚（アグー）の効率的繁殖技術の確立

(6) 凍結精液希釈液への鶏卵黄由来低密度リポタンパク質 (LDL) の添加が融解後の精子性状に及ぼす影響

仲村敏 建本秀樹* 島袋宏俊 稲嶺修
山内昌吾* 与古田稔

I 要 約

琉球在来豚(アグー)精子に適した凍結保存技術の確立を目的に、鶏卵黄中に含まれる低密度タンパク質(LDL)を抽出し、凍結用希釈液へのLDL添加効果について検討した。凍結用希釈液へ添加したLDL濃度は、2%、4%、6%、8%、10%の5水準で区分し(LDL添加区)、20%の鶏卵黄添加を対照区(EY20%添加区)として凍結・融解後の精子性状を比較した。

1. LDL6%添加区は、EY20%添加区より融解 3 時間後の運動精子率(Motile)、前進運動精子率(Progressive)が高く($P<0.05$)、効果的に運動性を維持していた。
2. LDL4%および6%添加区は、EY20%添加区より、精子細胞膜を正常に維持した割合が高く($P<0.05$)、細胞膜障害を抑制する傾向が認められた。
3. LDL6%添加区は、EY20%添加区より精子先体タンパク質酵素活性が高く($P<0.05$)、精子先体の正常性が維持されていた。
4. LDL6%添加区は、EY20%添加区より細胞内ATP量およびミトコンドリアの正常性を維持した割合が高く($P<0.05$)、精子生存性が維持される傾向が認められた。
5. LDL添加区は、EY20%添加区より細胞内コレステロール量が増加する傾向が認められた。しかし、全ての試験区において体外受精(IVF)における精子受精能に有意差は認められず、コレステロール量増加による受精能抑制作用は認められなかった。

以上の結果、凍結用希釈液へのLDLの添加は、凍結・融解後の精子性状性を効果的に維持することが示唆され、至適濃度は6%であった。これは、LDLの添加により、細胞膜のコレステロールの授与作用などを介して精子の細胞膜流動性が向上し、精子の凍結障害を緩和した結果であると推察され、アグー凍結精子を作製する上で有効な方法であると思われた。

II 緒 言

アグーは、近交退化の影響と考えられる繁殖能力の低下が認められる¹⁾。雄では一般西洋品種と比較して精子性状が著しく劣っており、授精に適した液状または凍結精液が得られにくい。このことがアグーの増殖を妨げる一要因となっている²⁾。しかし、ブタ精子の凍結保存技術は、以前からその重要性を指摘されているものの生産現場においては未だ実用化の域に達していない。また、アグーの場合、一般的に利用されている豚凍結精液製造マニュアル³⁾に従って凍結処理を行っても、利用に耐えうる活力を有した精子は得られない。そのため、効率的にアグーの増殖を行うためには、アグー精子に適した凍結保存技術を確立し、年間通じて安定的かつ広域的に精子を利用することが重要である。

著者ら²⁾は、一般的に行われている精子の凍結処理工程や精子処理液を見直すことでアグーの精子性状が改善されたことを報告している。さらに凍結時の酸化ストレスを抑制するため、凍結希釈液へのアスコルビン酸(AA-2G)添加により、融解後の精子運動性や精子細胞膜正常性を効果的に維持できることも報告した⁴⁾。しかし、本方法においても凍結・融解時には約6割の精子に細胞膜障害が認められ、運動性やその他精子性状などもまだ授精に適した水準に達していない。

一般的に凍結用精子希釈液には、凍結障害を緩和するための鶏卵黄が添加されているが、その有効性に対する詳細な作用機序については判っていない。ブタの精子原形質膜は、他の家畜と比較してリン脂質

に対するコレステロール含量が低く、膜流動性が劣っている。そのため凍結時には細胞障害の影響を受けやすいことが報告されている⁵⁾。しかし近年、Huら⁶⁾により鶏卵黄中のLDLが精子凍結における有効な作用物質であるとする報告がなされた。LDLは、鶏の卵黄に多量に含まれており、その構造は85～90%の脂質と10～15%のタンパク質で構成され、トリグリセリドとコレステロールを核とし、周りをタンパク質とリン脂質で構成された膜によって覆われた構造を呈している。このLDLが、凍結・融解過程において精子細胞膜表面に付着し、細胞膜中のコレステロール比を上昇させ、細胞膜流動性を高めることにより、精子の細胞障害が軽減されると考えられている⁷⁾。

そこで、本試験ではアグー精子に適した凍結保存技術の更なる改良を行うため、凍結用希釈液へ添加する鶏卵黄をLDL単体に置換し、LDLの添加が凍結・融解後の精子性状に及ぼす影響について検討した。

Ⅲ 材料および方法

1. 試験設定

試験は、鶏卵黄から抽出したLDLを単体で精子凍結用希釈液(mBF5)に添加し、凍結・融解後の精子性状を評価した。希釈液に添加するLDL濃度は2%, 4%, 6%, 8%, 10%の5水準で区分し(LDL添加区)、20%の鶏卵黄添加を対照区(EY20%添加区)とした。

精子性状性は、運動性、細胞膜正常性、精子先体タンパク質分解酵素活性、精子生存性、DNA正常性、ミトコンドリア正常性、精子受精能を指標として評価した。また、コレステロール量が精子性状へ与える影響を検討するため、精子細胞内のコレステロール量を測定した。

2. 期間および場所

試験は2007年2月から2009年1月に沖縄県畜産研究センターで実施した。

3. 供試精液

精液は、当センターで飼養しているアグー種雄豚4頭(個体番号:A-1, A-2, A-3, A-4)から手圧法により全精液を採取し、試験に供した。

4. 凍結精液の作製

凍結精液の作製は著者ら²⁾の常法に準拠して行った。採取精液から精漿を遠心除去した後、Beltsville thawing solution(BTS)で遠心洗浄を行い、Beltsville F5(BF5)で精子濃度が 10×10^8 sperm/mlになるよう調製し、約1時間かけ5℃まで冷却した。5℃で約2.5時間静置後、同温の5%glycerol加BF5を等量加え、0.5mlストロー管に封入し、液体窒素の液面上約4cmの高さで約20分間静置した後、液体窒素に浸漬し、凍結保存した。

5. 鶏卵黄からのLDLの抽出

LDLの抽出は、Moussaら⁸⁾の方法に準じて行った。鶏卵黄を生理食塩液で希釈した後、10℃、10000×g、45分間遠心し、卵黄顆粒を除去した。鶏卵黄上清液に少量ずつ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を添加し、4℃、10000×g、45分間の遠心によりタンパク質を除去した。上清液は、ヴィスキング透析チューブ(日本メディカルサイエンス社)内で2日間イオン水に浸漬し、脱塩透析を行った。脱塩後、チューブ内の溶液を4℃、10000×g、45分間遠心し、浮遊ペーストをLDLとして回収した。

6. 精子性状検査

1) 運動性・細胞膜正常性・先体タンパク質酵素活性・DNA正常性・精子受精能

各検査は著者ら²⁾の定法により行った。精子運動性は、精子運動性解析装置(Ceros Sperm Analyzer, Hamilton-Thorne Research)を用いて融解後0, 1, 3時間後のMotileおよびProgressiveを指標として評価した。

精子細胞膜正常性は、CFDA/PI 蛍光染色により緑色蛍光を呈する精子を細胞膜が正常に保持されている精子、赤色蛍光を呈する精子を細胞膜に障害を受けている精子として評価した。なお、検査は各処理区当たり650個以上の精子を観察した。

精子先体タンパク質酵素活性は、固相化ゼラチンスライドに形成された光輪(halo)直径を測定し、精子アクロシン活性の指標として精子先体正常性を評価した。

精子のDNA正常性検査は、中性コメットアッセイ法⁹⁾によりSYBR Green Iで細胞染色し、蛍光顕微鏡下で各処理区当たり100個以上の精子を観察した。なお、評価は、精子が障害を受け、断片化されたDNA像(DNAテール像)が観察されたものをDNAに障害を受けている精子とし、DNAテール像が観察されない

ものを DNA が正常に保持されている精子とした。

精子受精能は、IVF による卵への精子侵入率を指標とし、培養後の卵子のホールマウント標本により、卵細胞質内に精子頭部または雄性前核および尾部の両方が確認された卵を精子侵入として評価した。

2) 精子生存性(細胞内 ATP 量)

細胞内 ATP 量はルミカウンター (PTL300SA; 東洋製作所) を用いて測定した。凍結精液ストロー 0.5ml (2.5×10^8 sperm) を 39°C の PBS 溶液中で融解し、4°C, $700 \times g$, 4 分間の遠心洗浄を行った。遠心後、PBS 溶液により 0.5×10^8 sperm/ml に希釈し、 $100 \mu l$ の精子浮遊液と $300 \mu l$ 超純水を混合した後、4 分間の煮沸処理によりタンパク質を変性させた。その後、氷中で冷却し、ボルテックスにより攪拌後、4°C, $10000 \times g$, 4 分間の遠心、得られた上清液を被検材料とした。測定は、サンプル溶液 $100 \mu l$ に $400 \mu l$ のルシフェリン・ルシフェラーゼ溶液を添加、20 秒後に発光量を計測し、Blank 値を除いた値をルシフェリン発光量とし、検量線を基に ATP 量を算出して精子生存性とした。

3) ミトコンドリア正常性

凍結精液ストロー 0.5ml (2.5×10^8 sperm) を融解後、30ml の $1.0 \mu M$ MitoTracker Red CMXRos (Invitrogen 社) 加 PBS 溶液に懸濁し、 $12 \mu l$ の SYBR Green I で染色し、39°C, 20 分間の培養後、 $700 \times g$, 4 分間の遠心洗浄を行い、PBS 溶液で 0.1×10^8 sperm になるように希釈した。その後、350-460nm 励起波長、510nm 吸収波長の蛍光顕微鏡下で各処理区当たり 600 個以上の精子を観察し、中片部に強い赤色蛍光が認められた精子が正常にミトコンドリアを保持している精子として評価した。

4) 細胞内コレステロール量

細胞内コレステロールの測定は、cholesterol/cholesterol Ester Quantitation Kit (Bio Vision 社) を使用し、プロトコールに従い、マイクロプレートリーダー (Model 680, Bio-Rad 社) により吸光度 570nm で定量した。

6. 統計処理

すべての試験区で計 4 回の追試を行い、統計処理は統計解析ソフト R を用いて行った。Shapiro-Wilk normality test で正規性を確認し分散分析を行った後、有意差の認められた各処理区において Tukey-Kramer test で多重比較検定を行った。

IV 結 果

1. 精子運動性 (Motile, Progressive)

表 1 および表 2 に各 LDL 添加区における Motile と Progressive の成績を示した。その結果、融解直後 (0h) の Motile は、LDL4% 添加区と EY20% 添加区の全て個体で高い運動性を示す傾向にあった。しかし、融解後 1 時間 (1h) と 3 時間後 (3h) では、LDL4% および 6% 添加区が EY20% 添加区より有意に高い運動性を示した ($P < 0.05$)。

Progressive は、融解直後 (0h) では EY20% 添加区が LDL 添加区より有意に高い運動性 ($P < 0.05$) を示した。しかし、融解後 1 時間 (1h) では、LDL4% と 6% 添加区が EY20% 添加区より高い運動性を示し、3 時間後 (3h) においては LDL6% 添加区の全ての個体で EY20% 添加区より有意に高い運動性を示した ($P < 0.05$)。

表1 各LDL添加濃度における運動精子率 (Motile ; %)

個体番号	LDL (%)	融解後の経過時間 (h)		
		0	1	3
A-1	EY 20	71.9 ± 1.3 ^{ab}	42.4 ± 1.7 ^c	21.4 ± 1.4 ^c
	2	43.3 ± 1.6 ^c	27.6 ± 1.4 ^d	18.6 ± 1.3 ^c
	4	69.1 ± 1.4 ^{ab}	59.9 ± 1.1 ^a	39.4 ± 1.6 ^{ab}
	6	70.5 ± 1.4 ^{ab}	52.9 ± 1.6 ^b	42.7 ± 1.7 ^a
	8	73.7 ± 1.3 ^a	51.5 ± 1.6 ^b	33.9 ± 1.6 ^b
A-2	EY 20	64.7 ± 1.6 ^b	38.0 ± 1.7 ^b	20.4 ± 1.3 ^b
	2	47.5 ± 1.6 ^d	37.3 ± 1.6 ^b	15.5 ± 1.2 ^c
	4	67.7 ± 1.5 ^{ab}	52.4 ± 1.2 ^a	32.8 ± 1.5 ^a
	6	69.3 ± 1.4 ^{ab}	52.3 ± 1.7 ^a	31.3 ± 1.6 ^a
	8	72.8 ± 1.4 ^a	35.1 ± 1.6 ^{bc}	24.6 ± 1.4 ^b
A-3	EY 20	54.9 ± 1.7 ^b	33.4 ± 1.6 ^b	18.9 ± 1.3 ^c
	2	47.6 ± 1.7 ^{cd}	42.0 ± 1.7 ^a	25.9 ± 1.5 ^{ab}
	4	51.8 ± 1.7 ^{bc}	42.8 ± 1.1 ^a	29.5 ± 1.5 ^a
	6	61.6 ± 1.6 ^a	40.9 ± 1.7 ^a	23.5 ± 1.4 ^{bc}
	8	51.6 ± 1.7 ^{bc}	30.9 ± 1.6 ^b	20.2 ± 1.4 ^c
A-4	EY 20	71.4 ± 1.4 ^a	39.1 ± 1.6 ^c	12.8 ± 1.1 ^c
	2	38.0 ± 1.5 ^c	38.2 ± 1.4 ^c	8.3 ± 0.8 ^d
	4	69.0 ± 1.4 ^a	56.5 ± 1.2 ^a	32.7 ± 1.4 ^a
	6	63.4 ± 1.4 ^b	48.9 ± 1.5 ^b	22.6 ± 1.4 ^b
	8	68.4 ± 1.3 ^a	47.3 ± 1.5 ^b	22.7 ± 1.4 ^b
	10	69.6 ± 1.4 ^a	31.9 ± 1.5 ^d	21.1 ± 1.3 ^b

注1) 平均±標準誤差。

2) 同個体の縦列内で異符号間に有意差有り (P<0.05)。

表2 各LDL添加濃度における前進運動精子率 (Progressive ; %)

個体番号	LDL (%)	融解後の経過時間 (h)		
		0	1	3
A-1	EY 20	9.9 ± 0.9 ^a	5.4 ± 0.8 ^b	3.2 ± 0.6 ^{cd}
	2	2.0 ± 0.5 ^c	2.3 ± 0.5 ^c	1.6 ± 0.4 ^d
	4	6.6 ± 0.8 ^b	12.8 ± 1.1 ^a	4.7 ± 0.7 ^{bc}
	6	6.5 ± 0.8 ^b	14.1 ± 1.1 ^a	8.5 ± 0.9 ^a
	8	6.1 ± 0.7 ^b	13.5 ± 1.1 ^a	6.6 ± 0.8 ^{ab}
A-2	EY 20	11.8 ± 1.1 ^a	8.7 ± 1.0 ^c	2.9 ± 0.6 ^b
	2	2.4 ± 0.5 ^d	5.5 ± 0.8 ^d	1.9 ± 0.5 ^b
	4	7.7 ± 0.9 ^{bc}	13.9 ± 1.2 ^a	7.4 ± 0.9 ^a
	6	8.9 ± 0.9 ^{ab}	13.2 ± 1.1 ^{ab}	6.1 ± 0.8 ^a
	8	5.6 ± 0.7 ^c	13.1 ± 1.2 ^{ab}	7.4 ± 0.9 ^a
A-3	EY 20	7.4 ± 0.9 ^a	7.9 ± 0.9 ^c	2.9 ± 0.6 ^b
	2	3.7 ± 0.6 ^b	5.3 ± 0.8 ^c	3.5 ± 0.6 ^b
	4	6.1 ± 0.8 ^{ab}	12.5 ± 1.1 ^a	4.2 ± 0.7 ^{ab}
	6	5.8 ± 0.8 ^{ab}	11.8 ± 1.1 ^{ab}	6.4 ± 0.8 ^a
	8	4.6 ± 0.7 ^{ab}	6.3 ± 0.8 ^c	4.2 ± 0.7 ^{ab}
A-4	EY 20	13.1 ± 1.1 ^a	9.0 ± 0.9 ^c	2.9 ± 0.6 ^{de}
	2	0.9 ± 0.3 ^c	5.6 ± 0.7 ^d	1.4 ± 0.4 ^c
	4	10.5 ± 0.9 ^a	21.4 ± 1.2 ^a	9.2 ± 0.9 ^a
	6	7.1 ± 0.8 ^b	14.0 ± 1.0 ^b	5.7 ± 0.8 ^{bc}
	8	6.8 ± 0.7 ^b	12.5 ± 1.0 ^{bc}	4.9 ± 0.7 ^{cd}
	10	5.9 ± 0.7 ^b	10.2 ± 0.9 ^c	8.4 ± 0.9 ^{ab}

注1) 平均±標準誤差。

2) 同個体の縦列内で異符号間に有意差有り (P<0.05)。

2. 精子細胞膜正常性および精子先体タンパク質酵素活性

図 1 に各 LDL 添加区における精子細胞膜正常率(図 1-A)および精子先体タンパク質酵素活性(図 1-B)の成績を示した。その結果、精子細胞膜正常率では、LDL4%および 6%添加区が EY20%添加区より高い膜正常率を示す傾向にあった。いっぽう、LDL2%および 8%添加区は EY20%添加区より低い精子細胞膜正常率を示す傾向にあった。

精子先体タンパク質分解酵素活性では、LDL6%添加区の 1 頭(A-3)を除く全ての個体において EY20%添加区より有意に高い酵素活性を示したが(P<0.05)、その他の LDL 添加区では特に傾向は認められなかった。

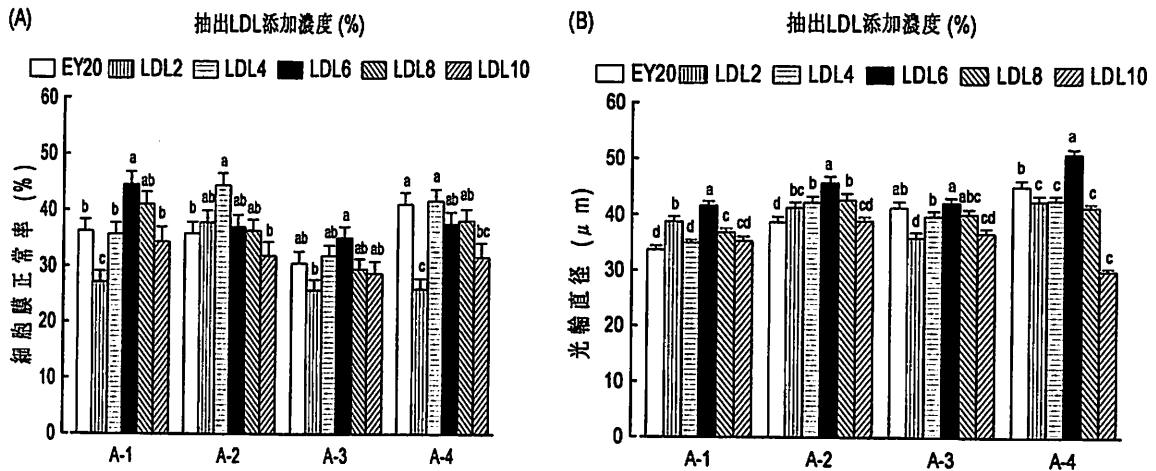


図 1 LDL 各添加区における精子細胞膜正常率 (A)・精子先体タンパク質分解酵素活性 (B)

注 1) 平均±標準誤差。

2) 同個体内の異符号間に有意差有り (P<0.05)。

3. DNA 正常性、細胞内 ATP 量およびミトコンドリア正常性

図 2 に DNA 正常率(図 2-A)、細胞内 ATP 量(図 2-B)およびミトコンドリア正常率(図 2-C)の成績を示した。その結果、DNA 正常性は、LDL6%添加区の 1 頭(A-3)の個体のみ EY20%添加区より有意に高い DNA 正常率を示し(P<0.05)、LDL2%および 10%添加区では、EY20%添加区より若干低い DNA 正常率を示す傾向にあった。

いっぽう、細胞内 ATP 量は、LDL6%添加区の 1 頭(A-3)を除く全ての個体において EY20%添加区より有意に高い精子生存性を示した(P<0.05)。しかし、LDL2%添加区の細胞内 ATP 量は、EY20%添加区より有意に低い値を示した(P<0.05)(図 2B)。

ミトコンドリア正常性では、LDL6%添加区全ての個体が EY20%添加区より有意にミトコンドリア正常率が高く(P<0.05)、LDL4%添加区においてもミトコンドリア正常率は、若干高くなる傾向にあった。

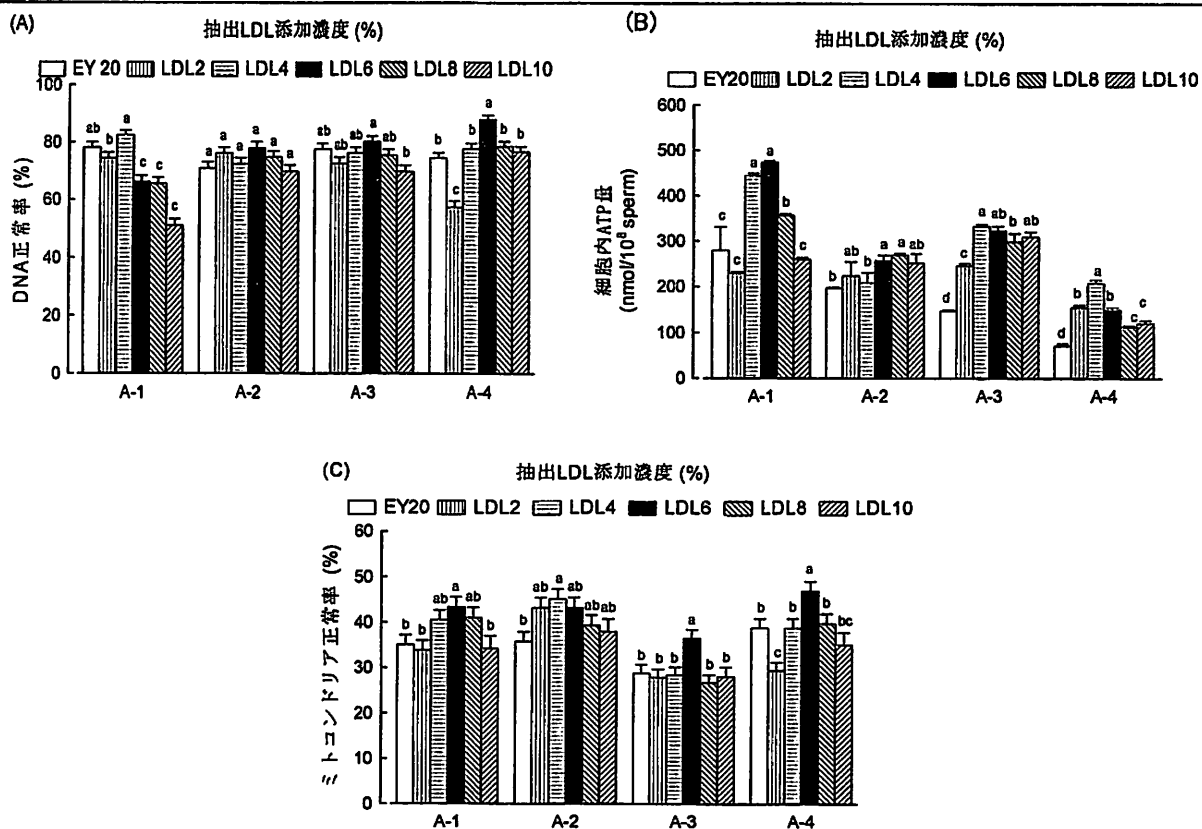


図2 各 LDL 添加区における DNA 正常率 (A)・細胞内 ATP 量 (B) ・ミトコンドリア正常率 (C)

注1) 平均±標準誤差。

2) 同個体内の異符号間に有意差有り (P<0.05)。

4. 細胞内コレステロール量および精子侵入率

図3に細胞内コレステロール量(図3-A)および精子侵入率(図3-B)の成績を示した。その結果, 細胞内コレステロール量は, LDL 添加区のほぼ全ての個体が EY20%添加区より有意に高い値を示した (P<0.05)。しかし, LDL の添加量と細胞内コレステロール量との間には比例した傾向は認められなかった。

いっぽう, IVF における精子侵入率は, LDL 添加区と EY20%添加区の全ての個体間において有意な差は認められず, コレステロールによる精子受精能への影響は認められなかった。

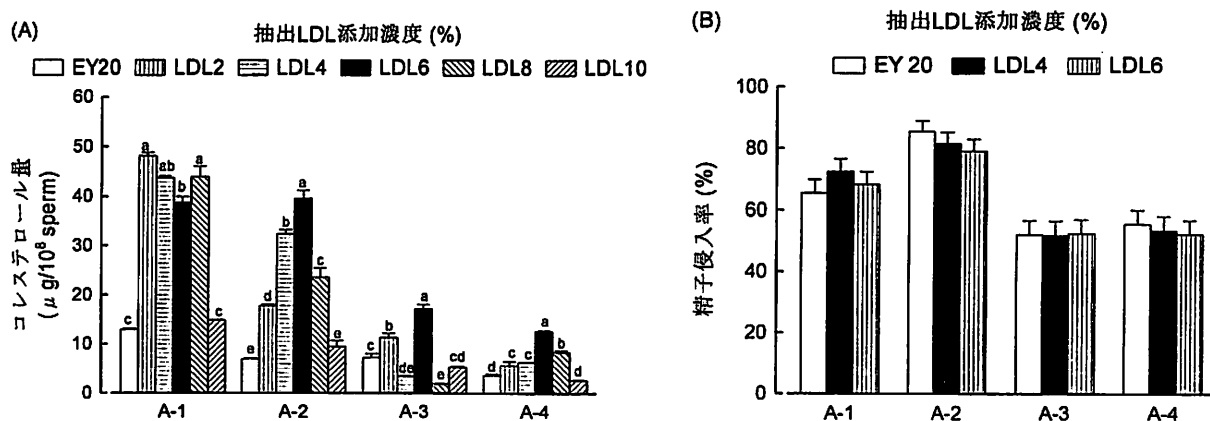


図3 各 LDL 添加区における細胞内コレステロール量 (A)・精子侵入率 (B)

注1) 平均±標準誤差。

2) 同個体内の異符号間に有意差有り (P<0.05)。

V 考 察

今回、鶏卵黄を LDL 単体に置換した精子凍結用希釈液を用いて、アグー精子の凍結処理を行い、LDL 添加が精子性状に及ぼす影響について検討した。

その結果、精子運動性は、LDL6%添加区で融解 3 時間後の Motile, Progressive が EY20%添加区より有意に高い運動性を維持していた ($P < 0.05$)。また、LDL4%および 6%添加区では、正常な細胞膜を維持した精子の割合が EY20%添加区より有意に高く ($P < 0.05$)、細胞膜の障害を抑制する傾向が認められた。LDL6%添加区は、精子先体の正常性についても有意に高く維持された ($P < 0.05$)。さらに、LDL6%添加区では、細胞内 ATP 量やミトコンドリアの正常性を維持した割合が EY20%添加区より有意に高く ($P < 0.05$)、精子生存性が高く維持される傾向が認められた。また、ほぼ全ての LDL 添加区で細胞内コレステロール量が EY20%添加区より有意に増加したにもかかわらず ($P < 0.05$)、IVF による精子受精能は全ての試験区において有意な差は認められず、コレステロールによる受精能抑制作用は認められなかった。

LDL は、精子の凍結・融解処理過程において、その構造が破砕され、トリグリセリドとリン脂質が溶液中に暴露される。それらが精子の細胞膜表面を覆うことにより、精子凍結時に発生する氷晶形成を伴う物理的細胞障害(凍結障害)が抑制されることが明らかになっている⁸⁾。さらに、Graham ら¹⁰⁾ は、LDL に由来するリン脂質が精子細胞膜上のリン脂質と置換することで、精子細胞膜の相転移温度を低下させると報告している。

今回の成績では、凍結希釈液へ LDL を 6%の割合で添加した場合に精子 DNA のダメージが軽減され、精子生存性などの精子性状性が効果的に維持された。これは、LDL のコレステロールにおける膜保護作用や授与作用などが複合して相乗的に働いたことで、精子細胞膜の流動性などが向上し、凍結障害に対して高い抵抗性を示したことが示唆された。

Hu らは⁹⁾、ブタ精子を凍結する際、凍結用希釈液へ 9%の割合で LDL を添加すると精子運動性が向上し、精子細胞膜や精子先体の正常性ならびにミトコンドリア活性が高く維持されたと報告している。しかし今回の研究結果においては、6%の割合で LDL を添加した場合に精子性状性が高く維持された。これは、ブタの個体間や品種間における精子性状性の違いによる影響、また、高濃度の場合、LDL の持つ膜保護作用より有害作用の影響の方が大きく作用したのではないかと思われた。実際に、Jiang ら¹¹⁾ は、LDL 加凍結用希釈液を用いてブタ精子を凍結した際、融解後の精子性状への効果は、ランドレースとデュロックで異なると報告している。また、著者ら²⁾ は凍結精子処理の工程や処理液について検討した際、アグーとランドレースの精子性状評価は異なることを報告している。

いっぽう、低濃度の LDL2%添加区は、凍結融解後の精子性状が EY20%添加区より著しく劣る結果であった。これは卵黄を 20%の割合で添加した場合、凍結用希釈液への LDL 含量は約 4~5%であることが著者らの予備試験により得られており、LDL2%の添加は卵黄 20%より LDL 含量が少ない。このことから、LDL2%添加区は EY20%添加区より LDL 含量が少ないために十分な効果が得られなかったと考えられた。

多様な物質を含む卵黄では、精子の凍結保存に有効な作用機序を解明する上で非常に複雑である。そのため、有効物質についての詳細は未だ明らかにされていない。また、凍結希釈液への卵黄添加は細菌やウイルス汚染の危険性も高くなる¹²⁾。さらに卵黄中には精子の凍結に際して負の作用を有する高密度リポタンパク質(HDL)や卵黄顆粒なども存在し、こうした物質が LDL の有効作用を妨げているとも考えられる。したがって、今回の研究で卵黄を LDL 単体に置換し、凍結用希釈液へ添加した手法は、精子凍結に有効な様々な物質を検証していく上で非常に有効な方法であると考えられる。また、卵黄中のホスファツジルコリンやホスファチジルセリンなども精子凍結に有効であると報告されている^{13, 14)} ことから、今後は、LDL 加凍結用希釈液へ卵黄中の有効単体物質を順次追添加し、凍結精液保存技術のさらなる向上をめざす必要がある。

VI 引 用 文 献

- 1) 大城まどか・仲村敏・鈴木直人・太田克之・渡久地政康(2003)琉球在来豚(アグー)を活用した銘柄豚の確立(2)アグーの繁殖性および哺育・育成成績への近親交配による影響、沖縄畜試研報, 41, 67-70
- 2) 仲村敏・大城まどか・稲嶺修・鈴木直人・吉元哲兵・建本秀樹・渡慶次功・玉代勢秀正(2005) 琉球

- 在来豚(アグー)の効率的繁殖技術の確立(1)ブタ凍結精液作製時の室温放置に用いる精子処理液と放置時間の検討, 沖縄畜研セ研報, 43, 12-20
- 3)丹羽太左右衛門監修(1989)豚凍結精液利用マニュアル, 日本家畜人工授精師協会
- 4) 仲村敏・島袋宏俊・稲嶺修・吉元哲平・山内昌吾・建本秀樹・与古田稔(2007) 琉球在来豚(アグー)の効率的繁殖技術の確立(4)凍結精液希釈液へのアスコルビン酸- α -グルコシドの添加が融解後の精子性状に及ぼす影響, 沖縄畜研セ研報, 45, 31-36
- 5)Watson, P.F(1981)The effects of cold shock on sperm cell membranes.In:Effects of low temperatures on biological membranes,London Academic Press,189-218
- 6)Hu JH, Li QW, Li G,Chen XY, Yang H, Zhang SS, Wang LQ(1996)The cryoprotective effect on frozen-thawed boar semen of egg yolk low density lipoproteins, *Asian-Aust. J. Anim*, 19, 486-490
- 7)Polge. C, Ashwood-Smith, MJ, Farrant. J(1980)Fertilizing of spermatozoa.In:Low temperature preservation in medicine and biologykonma, Tunbridge Wells,Kent:Pitman Medical 45-64
- 8)Moussa M, Martinet V, Trimeche A, Tainturier D, Anton M(2002)Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method:cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen, *Theriogenology*, 57, 1695-1706
- 9)Frazer L, Strzeek J(2005) Effects of freezing-thawing on DNA integrity of boar spermatozoa assessed by the neutral comet assay, *Reprod Domest Anim*, 41, 530-536
- 10)Graham JK, Foot RH(1987)Effect of several lipids fatty acyl chain length and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing, *Cryobiology*, 24, 42-52
- 11)Jiang ZL, Li QW, Hu JH, Li WY, Zhao HW, Zhang SS(2007)Improvement of the quality of boar cryopreservation semen by supplementing with low density lipoprote in diluents, *Cryobiology*, 54, 301-304
- 12)Ahmad K, Foote RH(1986)Post thaw survival and fertility of frozen bull spermatozoa treated with antibiotics and detergent, *J. Dairy Sci*, 69, 535-541
- 13)Foulkes JA(1997)Separation of lipoproteins from egg yolk and their effects on the motility and integrity of bovine spermatozoa, *J. Reprod. Fertil*, 49, 277-284
- 14)Quinn PJ, Chow PYW, White IG(1980)Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma site *J. Reprod. Fertil*, 60, 403-407