

豚精子の5°Cにおける生存性並びにアクロゾーム 形態に及ぼすカフェイン、テオフィリンの影響

吉田 重雄*・瀬崎 勝也**・田中 哲***

SHIGEO YOSHIDA, KATSUYA SEZAKI and SATORU TANAKA

Effect of caffeine and theophylline on motility and acrosome morphology
of boar spermatozoa at 5°C

要旨 ETCG 液を基本液とし、これにカフェインまたはテオフィリンを、実験1では終末濃度 0, 10, 20, 30, 40 mM, 実験2では 0, 5, 10, 15, 20 mM となるように添加した後、それぞれの液で豚精液を3倍に稀釈し、5°Cで1~5日間保存試験を行い、保存日数の経過に伴う精子活力、活力回復時間、pH、アクロゾーム形態の変化について比較検討を行った。その結果、全般的には保存日数の経過に伴いアナビオーシスからの回復が遅れる傾向が認められたが、カフェイン、テオフィリン添加区では無添加区に比べて明らかに高い活力を維持し、活力の回復も早く、pHの低下も認められなかった。また添加区相互の間では、5~20 mMの低濃度区の方が活力の回復が早く、30~40 mMと濃度が高くなるにつれてアナビオーシスからの回復が遅れるが、35°Cで長時間高い活力を維持する傾向が認められた。さらにアクロゾームの形態変化に及ぼす影響を併せ考慮すると、本実験におけるカフェイン、テオフィリン添加の適濃度は10~15 mMであると考えられる。

結 言

豚精子は他の家畜精子に比べて低温感作の影響を強く受けるため、従来その保存は15~20°Cが適温であるとされて来た^{1~3)}。しかしながら15~20°Cに保つことが案外難かしいこと、また実用上の有効保存時間が2~3日にすぎなかったこと、および、豚精子は保存中にアナビオーシスに陥るため¹⁾、活力検査を行うに当っては予め30~35°Cで長時間インキュベートすることによって精子活力の回復をはからねばならぬなどの煩雑さが、豚の人工授精技術の普及上の隘路の1つとなっている。

最近豚精液の液状保存においても、温度ショックを避けつつ5~7°Cに保存すれば、従来の15~20°C保存に比べて良い成績がえられることが知られ、実用化

へと進んでいる^{4~7)}。また GARBERS *et al.*^{8~10)} によって cAMP の分解酵素であるホスホジエステラーゼの阻害剤として知られるカフェイン、テオフィリンの添加が、各種家畜精子の運動性を高め、外因性基質による呼吸を促進することが知られて以来、豚精子のアナビオーシスからの回復の促進、生存性の延長の目的での応用試験が2・3報告^{6,11~13)} されている。

著者らは従来から豚精液保存の際の各種稀釈液について比較試験を試みて来たが、5°C保存において比較的優れた特性を示した ETCG 液¹⁴⁾ を選び、これにカフェイン、テオフィリンを添加した際の適濃度の検討、および豚精子活力並びにアクロゾーム形態に及ぼす影響について検討し、若干の知見をえたのでここに報告する。

* 京都府立大学農学部畜産学研究室
Laboratory of Animal Science, Faculty of Agriculture, Kyoto Prefectural University

** 京都府嵯高原総合牧場
Kyoto Prefectural Ikari Livestock Farm

*** 兵庫県南淡路農業改良普及所
South Awaji Branch of Hyogo Agricultural Development and Advisory Service
昭和56年7月13日受理

材料および方法

精液は本学実験畜舎で飼養中の大ヨークシャー種1頭、ランドレース種1頭より手圧法で採取した全精液を二重ガーゼで濾過して膠様物を除去した後実験に供した。採取した精液は30°Cにおいて各種の性状を検査後、まず予備実験として、豚精子の活力に及ぼすpHの影響を確かめるため、予めガラス電極pHメーター

を用いて正確に測定し、pH 8.0~5.5の範囲で12段階のSÖRENSEN bufferを作り、その各々で豚精液を3倍に稀釈し、稀釈直後と35°Cで10分間インキュベート後に精子活力とpHとをそれぞれ測定した。なおこの際の精液pHの変化については、東洋濾紙製pH試験紙PR(フェノールレッド)を用いて測定を行ったが、予め測定したガラス電極によるpH測定値とPR試験紙によるpH値との関係を示すと表1のごとくである。

Table 1. Comparison of pH values of Sörensen buffers measured by electric pH meter and by pH test paper (PR).

Electric pH meter*	7.99	7.71	7.38	7.16	6.99	6.85	6.68	6.50	6.29	5.99	5.70	5.50
pH test paper** (PR)	8.2	7.9	7.4	7.1	7.0	6.9	6.6	<6.2				

* Beckman Zeromatic SS-3

** Toyo Filter Paper Co. Ltd. Phenol-red

次に表2に示す様な加藤¹⁴⁾の創製になるETCG液を基本とし、これにカフェインまたはテオフィリンを実験1では終末濃度0, 10, 20, 30, 40 mMとなるように、実験2では5, 10, 15, 20 mMとなるように添加した稀釈液で3倍稀釈を行った後、原精液と共に30°Cの温湯の入ったマホー瓶中に浸漬し、これを5°Cに保った冷蔵庫内に入れ、温度ショックを避けつつ5°Cまでゆっくりと冷却後、5日間保存を行った。精子の活力検査に当っては、各保存精液1 mlを小試験管にとり、35°Cの恒温振盪機に45°の角度で挿入し、インキュベート(水平振盪100回/分、振巾1.5 cm)し、振盪開始より10分おきにサンプルをとり、38°C下で精子活力を検鏡して、これを精子生存指数¹⁵⁾で表わし、その最高値をもってその区の精子活力とし、また精子活力が最高値を示すまでの時間を活力回復時間とした。また保存精液のpHは前記pH試験紙PRを用いて測定した。

Table 2. Composition of ETCG by Kato¹⁴⁾

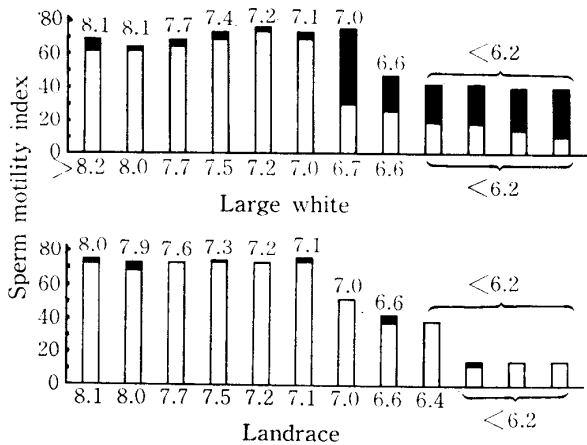
Ingredients	Quantity per 1,000 ml diluent
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	10.76 g
Citric acid	5.33 g
Egg yolk	200 ml
Glucose	26.67 g
Penicillin G - K	500,000 IU
Dihydro streptomycin sulfate	0.500 g

なお、精液保存中における精子アクロゾーム形態の変化について検討するため、稀釈直後と保存5日後に各種保存精液をそれぞれ2枚宛のスライドガラス上に塗沫風乾後、オルト固定し、大沼¹⁶⁾の方法でアクロゾーム染色を行った後、スライドガラス1枚につき300個の精子を算え、アクロゾームの形態を白山¹⁷⁾の方法に従って正常、前縁濃染、膨化、崩壊または脱落の4段階に分類した。(写真1~4参照)

結 果

1. 予備実験：豚精子の活力に及ぼすpHの影響

図1に示すごとく、大ヨークシャー種、ランドレース種ともに稀釈直後の液のpHが7.1以上の場合には、稀釈直後の生存指数がそれぞれ63.8~75.4(平均70.3)および72.9~75.4(平均74.2)、また10分間のインキュベーション後の生存指数がそれぞれ61.2~72.9(平均66.0)および68.4~72.9(平均72.2)といずれも高く、活力の低下はごく僅かであったが、稀釈直後のpHが7.0の場合には、大ヨークシャー種では稀釈直後は75.4と高い生存指数を示したが、10分後には30.4と著しく低下し、またランドレース種では稀釈直後にすでに52.0と生存指数がかなり低下することが認められた。さらに稀釈直後の液のpHが6.6以下になると、稀釈直後から生存指数が低下する傾向が一層著しく認められた。なお、この様に大ヨークシャー種の精子とランドレース種の精子との間にpHの低下に対する抵抗性の差が認められたことは興味あることではあるが、この様な差が何に起因して起ったのか、また果して品種による差であるのかは判らない。いずれにし



Figures above the columns indicate pH values measured just after dilution.
 ■ Sperm motility index just after dilution.
 □ Sperm motility index 10 min. after incubation.
 Figures under the columns indicate pH values measured at 10 min. after incubation.

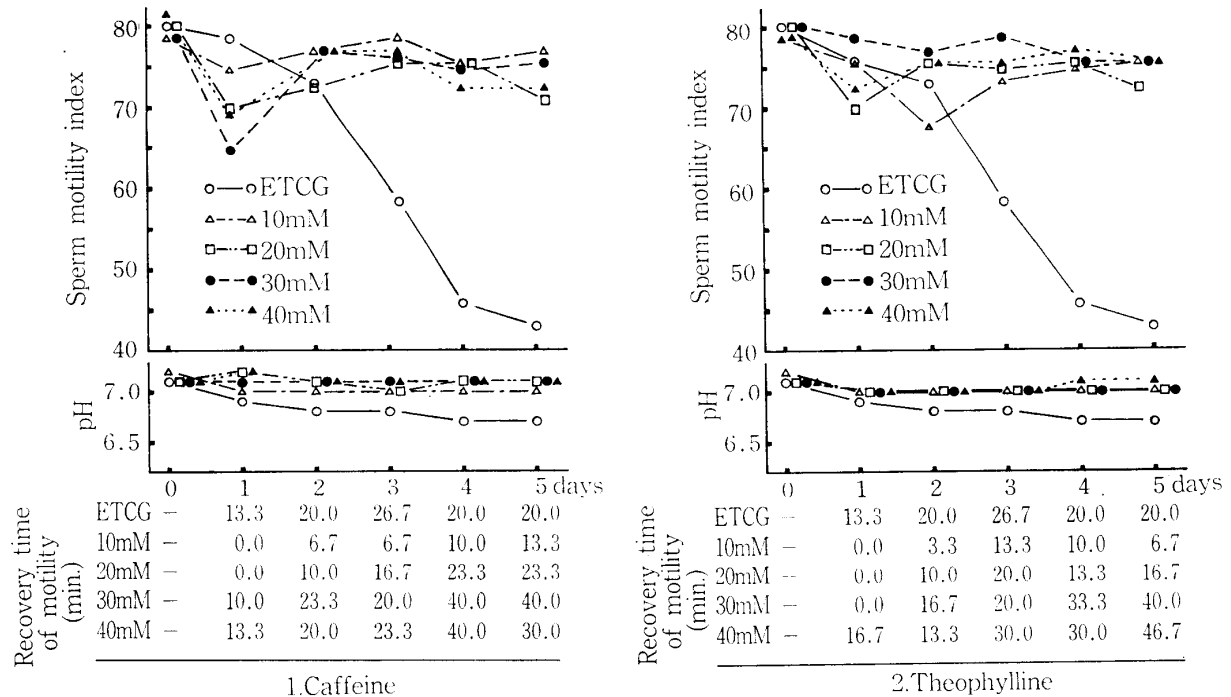
Experiments were replicated 3 times.

Fig. 1. Effect of pH of diluent on the motility of boar sperm.

でも、豚精子においては稀釈後の pH が 7.0 以下になると、精子活力に悪影響が現われるものと思われる。

2. ETCG 液に対するカフェイン、テオフィリン添加が豚精子の活力、pH、活力回復時間に及ぼす影響

実験 1：ETCG 液に対してカフェインまたはテオフィリンを 10~40 mM 添加して 5°C に保存した際の豚精子の活力、精液 pH および活力回復時間に及ぼす影響を示すと図 2 のごとくである。カフェイン、テオフィリンの無添加区では稀釈直後から保存 2 日後まではかなり高い活力を示したが、以後は保存日数が経過するに伴って急に低下し、5 日後には生存指数 43.0 となった。これに対してカフェイン、テオフィリン添加区では、保存 1 日後は無添加区よりも低い生存指数を示したが、保存 2 日目以降は却って高まり、以後 5 日後まで 70.7~76.9 とほとんど変らぬ生存指数を示した。なお、保存に伴う pH の変化を見ると、無添加区では保存 1 日後にすでに pH 6.9 となり、以後保存日数の経過に伴ってさらに低下する傾向が認められた。この ETCG 液の保存日数の経過に伴う精子活力の低下は、予備実験において認められたごとく、pH の低下がその一因となっているものと思われる。これに反してカフェイン、テオフィリン添加区では、pH の変化はほとんど認められず、保存 5 日後においても 7.0~7.1 を示した。図 2 の下段の表は保存日数の経過に伴う豚精子のアナビオーシスからの回復時間を示す。対照の



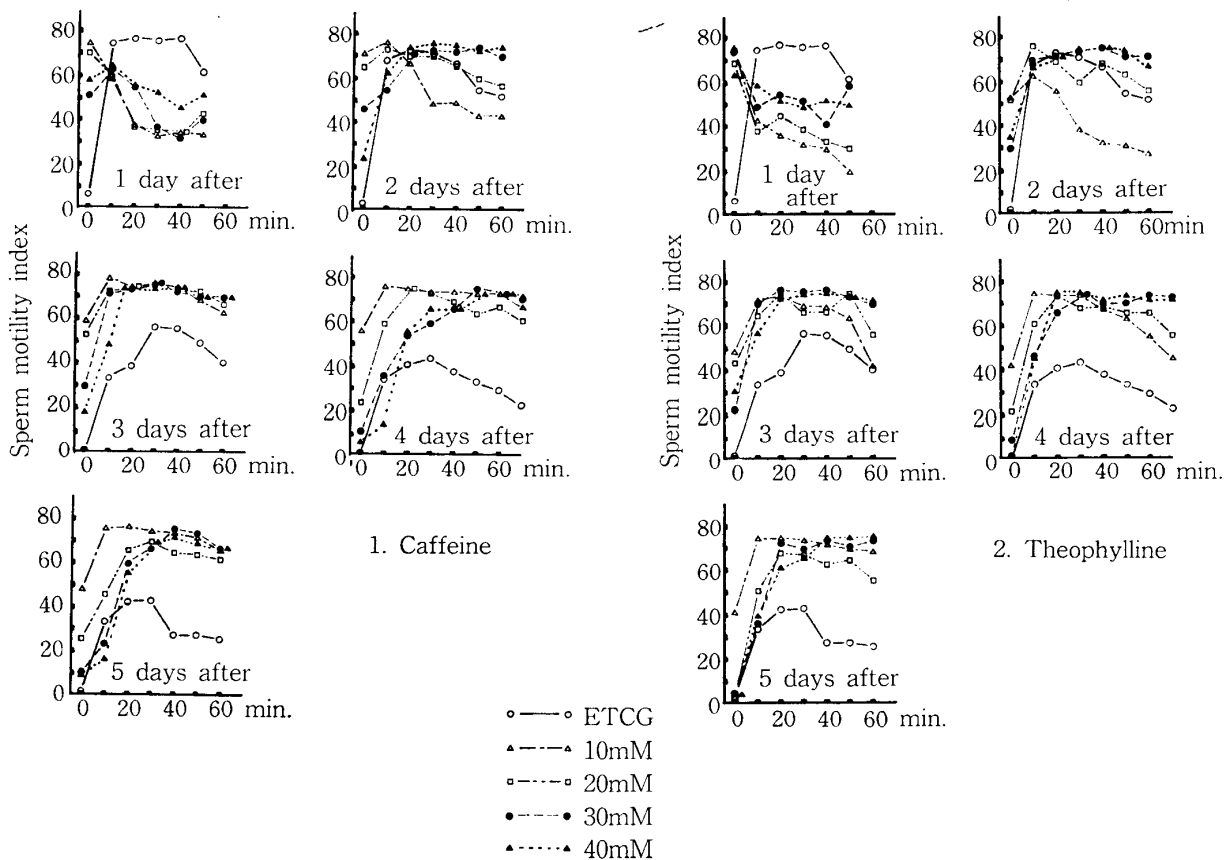
Experiments were replicated 3 times.

Fig. 2. Effect of caffeine or theophylline concentration on motility of boar spermatozoa, pH of diluted semen and on recovery time of motility after 1-5 days storage at 5°C.

ETCG 区では 1 日保存後からアナビオースからの回復に10数分を要するが、保存 5 日後でも20分で活力が回復した。一方、カフェイン、テオフィリン添加区のいずれにおいても同様な結果を示し、10mM 区では保存 1 日後は 35°C でのインキュベーションなしに活力検査盤上で直ちに活力が完全に回復しており、また保存日数が経過するに伴い若干のインキュベーション時間を必要とするが、保存 5 日後においても10数分で完全に活力の回復が認められた。20 mM, 30 mM, 40 mM と添加量が多くなるに従って回復時間が遅くなる傾向を示し、殊に 30mM 区の保存 4 日以後、40mM 区では保存 1 日後から対照の無添加区よりも回復時間が遅くなった。また図 3 は保存日ごとに 35°C におけるインキュベーション時間の経過に伴う活力の回復並びにその活力の変化を示したものである。この場合もカフェイン、テオフィリン添加区のいずれにおいても全く同じ様な傾向が認められた。すなわち 10mM 区、20 mM 区では保存 1~2 日後には活力の回復が早い代りにインキュベーション時間の経過に伴って活力が早く低下し、さらに保存 3~5 日後となるに従ってインキ

ュベーション当初の活力の回復が遅れるが、比較的長い間高い活力を維持する傾向が認められた。一方 30 mM 区、40 mM 区では保存 1 日後は別として、保存 2~5 日後ではインキュベーション当初の活力が低く、保存日数の経過につれて回復時間が遅れ、インキュベーションの終り頃になってはじめて高い活力を示した。

実験 2 : ETCG 液に対してカフェインまたはテオフィリンを 5~20 mM 添加して保存した際の豚精子の活力、精液 pH および活力回復時間に及ぼす影響について示すと図 4 のごとくである。この場合、添加区の精子活力は稀釈当日においては原精液区および ETCG 区に比べて低い精子生存指数を示したが、保存 1 日後には ETCG 区とほぼ同じ位まで回復し、2 日以降は原精液区と ETCG 区の活力が次第に低下するのに対し、添加区はいずれも活力の低下がほとんど認められなかった。なお添加区の間では、濃度の高くなる程高い活力を示す傾向が認められ、カフェイン添加区の保存 4 日と 5 日後においては、5 mM 区と 20 mM 区との間に有意差 ($p < 0.05$) が認められた。また保存日数の経過に伴う精液 pH の変化については、原精液区お



Experiments were replicated 3 times.

Fig. 3. Effect of caffeine or theophylline concentration on the recovery time of sperm motility incubated at 35°C after 1-5 days storage at 5°C.

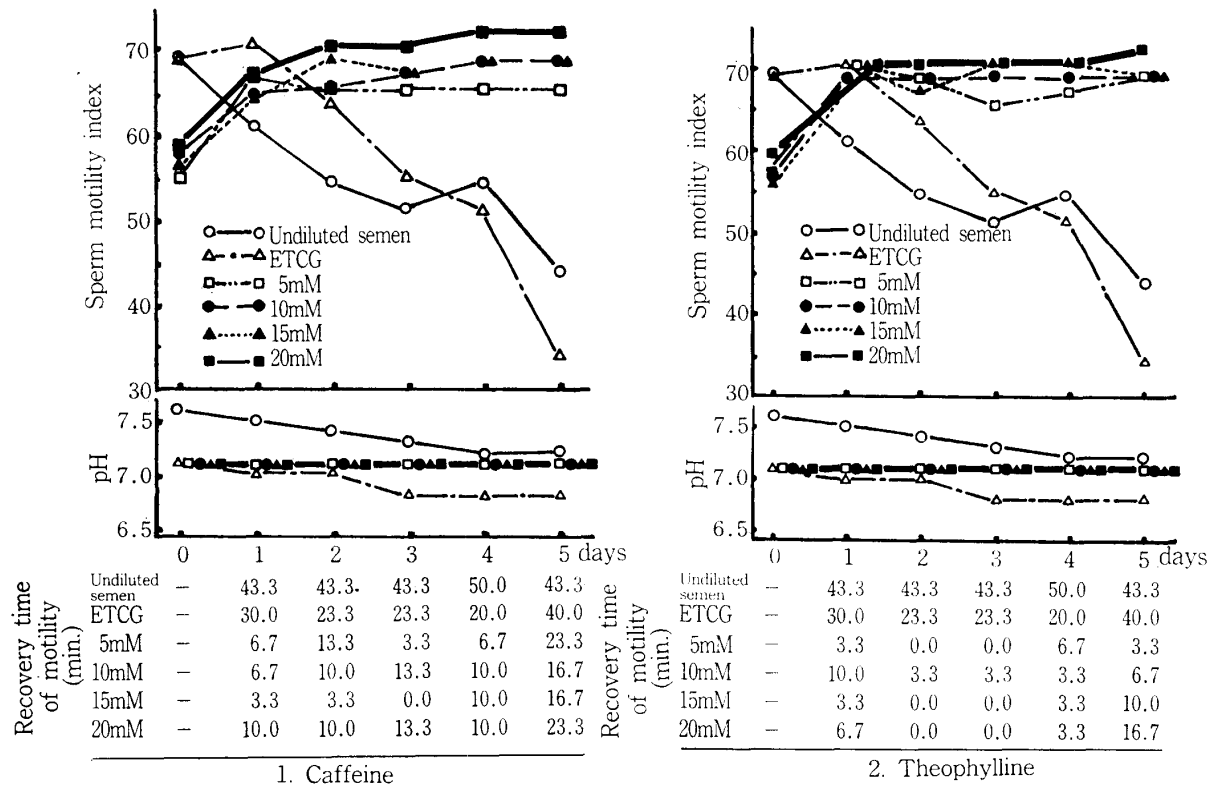


Fig. 4. Effect of caffeine or theophylline concentration on motility of boar spermatozoa, pH of diluted semen and on recovery time of motility after 1-5 days storage at 5°C.

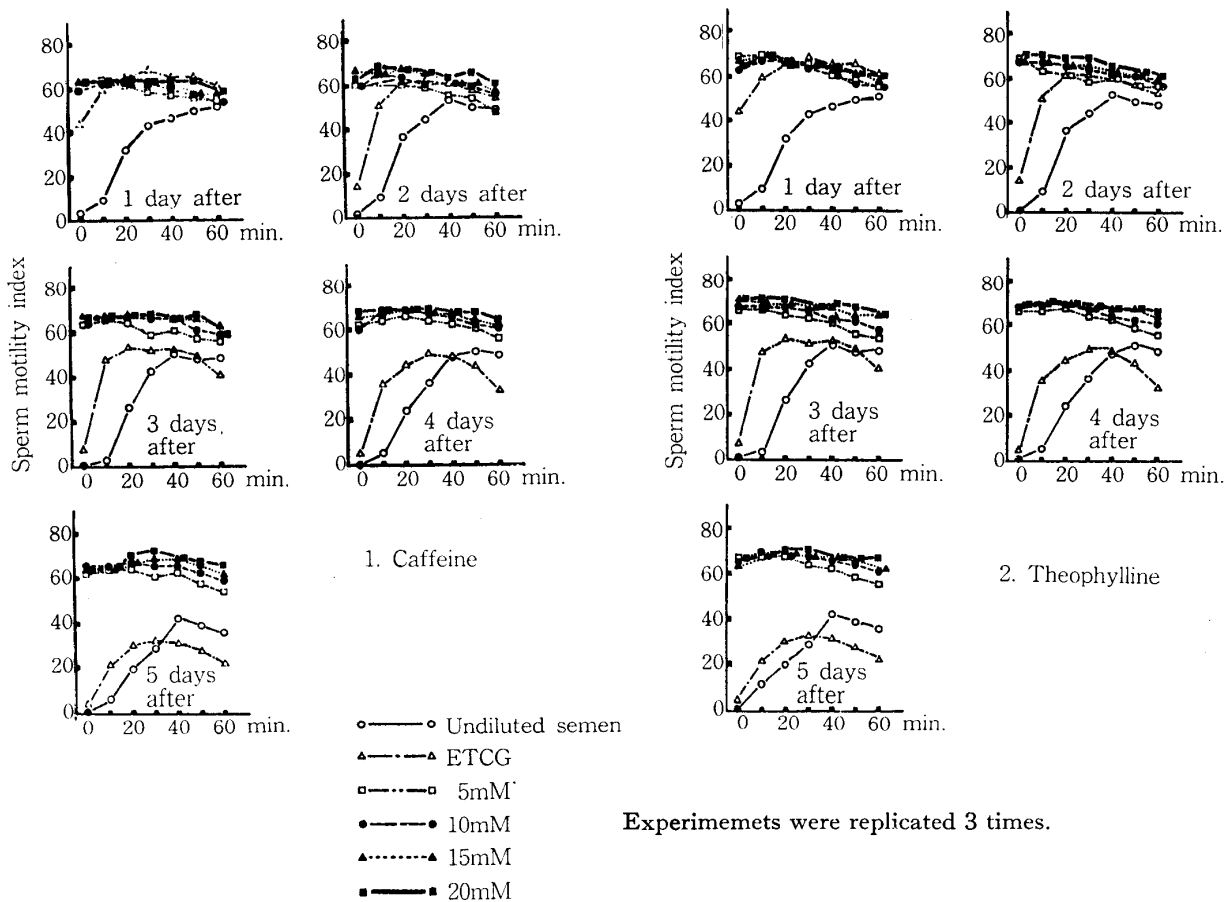
よび ETCG 区では保存日数の経過に伴って pH が低下し、とくに ETCG 区では保存 3 日後に pH が 6.8 以下に低下し、同時に精子活力も急低下する傾向が認められた。一方、カフェイン、テオフィリン添加区では実験 1 同様 5 日の保存期間を通じて pH 7.1 と全く変化が認められなかった。図 4 の下段の表は保存日数の経過に伴う豚精子のアナビオーシスからの回復時間を示す。この場合精液を採取した時期が実験 1 の時とかなりかけ離れた時期であった為か、ETCG 区および同じ添加濃度である 10 mM, 20 mM 区の活力回復時間が実験 1 の時と必ずしも一致しなかったが、5~15 mM 区の方が 20 mM 区よりも若干回復時間が早い傾向が認められた。また、ETCG 区は添加区に比べるとかなり活力の回復が遅く、20~40 分かかったが、原精液区の活力回復が最も遅く、43~50 分を要した。また図 5 は保存日ごとに 35°C におけるインキュベーション時間の経過に伴う活力の回復並びにその後の活力の変化を示したものである。原精液区と ETCG 区では、インキュベート前には明かにアナビオーシスの状態にあり、インキュベーション時間の経過とともに徐々に活力が回復し、活力が最高に到達後は再び低下する傾向が認められた。一方カフェイン、テオフィリン

添加区では、いずれもインキュベート前から高い活力を示し、1 時間のインキュベーションの間に活力の変動はほとんど認められなかった。

3. ETCG 液に対するカフェインまたはテオフィリン添加が、豚精子のアクロゾーム形態に及ぼす影響

実験 1 : ETCG 液に対してカフェイン、またはテオフィリンを 10~40 mM 添加し、5°C に 5 日間保存前後のアクロゾーム形態変化を比較した結果を図 6-1 に示す。希釈直後においては正常アクロゾーム率が 97.2~98.3% で相互にほとんど差が認められなかった。保存 5 日後となると全体的に正常アクロゾーム率が低下し、前縁濃染が増す傾向が認められたが、無添加の ETCG 液が正常アクロゾーム率 65.5% と最も高く、カフェイン、テオフィリン添加区は正常アクロゾーム率がやや低くなる傾向が認められ、とくにカフェイン 20 mM 区、30 mM 区では無添加区との間に有意差 (p<0.05) が認められた。

実験 2 : ETCG 液に対してカフェインまたはテオフィリンを 5~20 mM 添加し、5°C に 5 日間保存前後のアクロゾーム形態変化を比較した結果を図 6-2 に示す。この場合も希釈直後に比べて保存 5 日後には全体的に正常アクロゾーム率が低下し、またカフェイン、テオ



Experimentemets were replicated 3 times.

Fig. 5. Effect of caffeine or theophyllin concentration on the recovery time of sperm motility incubated at 35°C after 1-5 days storage at 5°C.

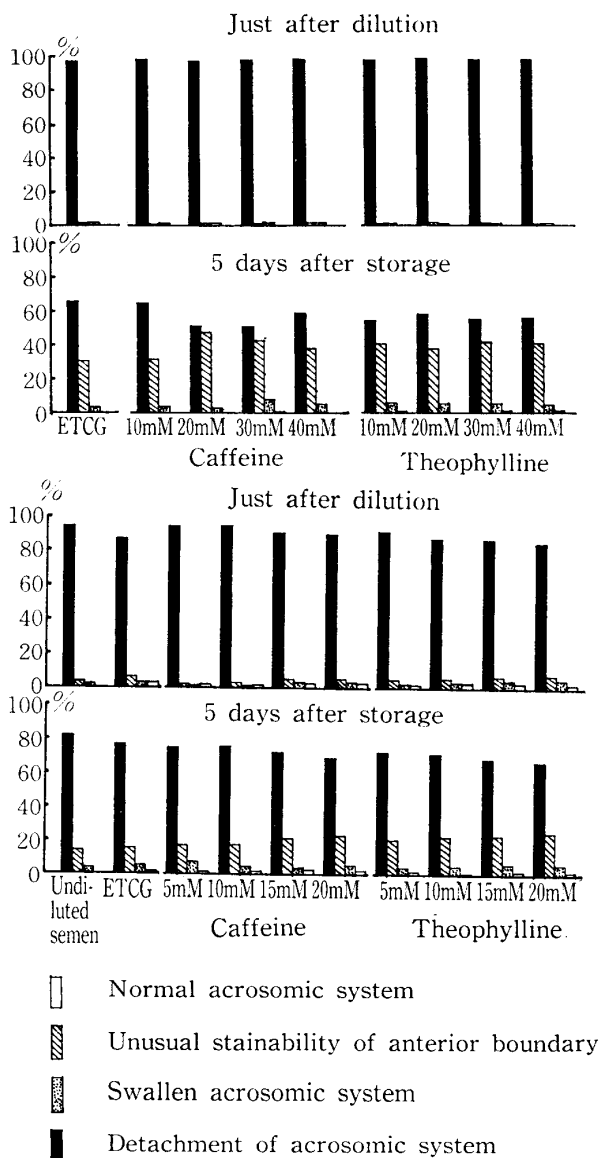
フィリン添加の濃度が高くなるにつれて、僅かながら低下して行く傾向が認められたが、いずれの比較においても有意差は認められなかった。なお実験1, 実験2を通じて正常アクロゾーム率が低下した結果, 主として出現するのは前縁濃染で, 次いで膨化したアクロゾームが僅かに現われるが, アクロゾームの崩壊または離脱した精子はほとんど認められなかった。

考 察

カフェイン, テオフィリンなどのメチルキサンチンが精子の呼吸と運動性とを著しく高めることを最初に報告したのは GARBERS *et al.*^{8~10)}である。彼らは牛精巢上体精子を用いて実験し, カフェイン添加により内因性呼吸は僅かしか高めないが, 基質添加の際, とくにピルビン酸, 酢酸, オキサロ酢酸を添加した際の呼吸を3~4倍にまで高め, またカフェイン添加により37°Cで4時間も運動性を維持すること, さらにこれらホスホジエステラーゼ阻害剤の添加により, 精子内cAMP含量が高まることを見出している。その後基礎

的研究についてはかなり多くの研究^{18~23)}が行われているが, その運動性促進のメカニズムについてはまだ十分には判っていない。一方, 人工授精や男性側の不妊治療の立場から精子の運動促進, 生存性延長をはかる目的での研究が, 人精子^{24~27)}, 牛精子¹¹⁾, 豚精子^{6, 11~13)}, 山羊精子²⁸⁾についても報告されているが, とくに豚精子についての報告は, それぞれの実験方法が異っており, カフェイン添加濃度も著しく異っているため, 精子活力や精子生存延長のためのカフェイン, テオフィリン添加適濃度が必ずしも決定されておらず, またカフェイン, テオフィリンの添加が, 受精時に関係をもつと言われる精子頭部のアクロゾーム形態に対してどの様に影響するかについては報告されていない。

著者らは豚精液を5°Cに保存する際に比較的良好的精子生存性を示すETCG液を基礎として, これにカフェイン, テオフィリンを添加して, まず保存後の日数の経過に伴う精子活力の変化について検討したところ, いずれも添加の効果が認められ, 対照のETCG区に比べてはるかに高い活力が維持された(図2, 図



Experiments were replicated 3 times.

Fig. 6. Effect of caffeine or theophylline concentration on the morphology of boar sperm acrosome before and after 5 days storage at 5°C.

4)。先にも述べたように、この際のETCG 区は活力の急低下とともに pH の低下も起っており、一方メチルキサンチン添加区はいずれも pH の低下が認められぬことから、一応両者の活力の差の原因は pH の低下にあるとも考えられる。しかしながら仔細に検討すれば、対照区における活力の低下の時期と pH が 6.9 以下になる時期とは必ずしも一致しておらず、また添加区相互間の pH にはほとんど差が認められなかったにも拘らず、メチルキサンチン添加量の差によって精子活力の変化に差が認められたことから、単なる pH の差に起因しているとは認められない。さらにこの際注目すべきことは、保存当日—1 日後で対照の ETCG 区の精子が旺盛な活力を示している時には、これらメ

チルキサンチン添加区の精子活力は対照区と同じ位か、むしろ低い活力を示したが、保存 3 日以後になって対照の ETCG 区の活力が次第に低下するにも拘らず、添加区の方は当初とほとんど変らぬか、僅かながら当初よりも高くなったことにより、顕著な活力の差が生じた点である。このことは活潑な代謝と運動を行っている精子に対しては、これらメチルキサンチンが作用しても、それ以上運動や代謝量を増加させぬが、精子の代謝が衰えかけるとこれを促進することにより、それ以上の活力の低下を防ぐ効果を持っているものと思われる。この点宮本¹³⁾も同様なことを観察し、カフェイン添加の効果は添加してすぐには現われず、生存指数がある程度低下した時に現われると述べている。なお実験 1, 2 の結果から、この際のカフェイン、テオフィリンの有効な添加濃度は 10~40 mM であると思われる。

次に保存後の精子を 35°C で 60 分間インキュベートした時のアナビオーシスからの回復時間と、その際の精子活力の変化の状態を見ると、カフェインまたはテオフィリンの添加は必ずしも精子のアナビオーシスからの回復時間を早めるとは限らず、30 mM, 40 mM と添加濃度が高まるにつれて活力回復時間が対照の無添加区よりも遅くなる傾向が認められた。一方、5~15 mM の低濃度の添加の場合には明かに活力回復時間は短くなり、5°C, 5 日後においても数分程度のインキュベーションでほぼ完全な活力の回復が認められた。和出ら⁶⁾は MC-14 稀釈液で豚精子を 6~7°C に長時間 (336~480 時間) 保存の場合の安息香酸カフェインの添加濃度は僅かに 6~10 mg % (0.28 mM~0.47 mM) であり、また 192 時間保存後の静置加温による精子活力の回復の場合には 8 mg % (0.38 mM) が適濃度であり、加温後僅かに 1.5 分で完全な回復が認められたと報告している。一方、番場ら¹²⁾は予めカフェイン溶液を塗沫乾燥後、38°C に加温したスライドガラス上に 15°C で 3 日間保存後の被検豚精液 10 μl をとり、カバーガラスをかけて検鏡することにより、2 分以内にアナビオーシスからの回復を認めているが、この際の最高の活力を示すスライド上でのカフェインの計算上の濃度は 27.8 mM~55.6 mM であったという。さらに宮本ら¹³⁾は豚洗浄精子に 10 mM のカフェインを添加し 37°C でインキュベートすると、基質無添加の場合、精子活力はカフェイン添加直後から無添加区に比べて有意に高くなり、高い活力は 1 時間後まで続いたと報告している。この様に活力の速かな回復のためのカフェインの適濃度についても研究者によってかなりの差が認められるが、それぞれの実験条件が異なるため、直

ちにこれらを比較して論じることは困難であると思われる。すなわち、著者らは保存精子の活力の回復を35°Cにおける10分毎の加温振盪で観察しているが、和出ら、番場らの場合には、37°Cの活力検査盤上でカバーガラスをかけての静置加温であるために空気(酸素)の供給が十分であるとは言い難く、また宮本らの場合は著者らと同じく37°Cにおける加温振盪であるが、1時間毎の観察であるために活力の回復の状態を細かく追究していない等観察条件が異なっており、一概には言えぬが、豚精子のアナビオーシスからの回復に対しては添加カフェイン濃度はかなり低くても効果があるものと思われる。

PURSEL *et al.*^{29, 30)} は保存した精子の受精能力を *in vitro* で推定する方法として、精子頭部アクロゾームの形態検査を提唱している。著者らがカフェインまたはテオフィリンを添加し豚精子を5°Cに5日間保存した際の精子アクロゾームの形態に及ぼす影響について検討した結果は、図6に示すごとく、メチルキサンチン添加区はいずれも無添加区に比べて正常精子率がやや低い傾向が認められた。このことはGARBERS *et al.*の一連の研究によって、メチルキサンチンの添加は精子内のホスホジエステラーゼの阻害剤として働き、その結果、精子内cAMP量が増すことが確認されており、さらにDELGADO *et al.*³¹⁾ は人精子をcAMPと共に加温すると膜の構造の脆弱化を伴うとの報告がある点を考慮に入れると、うなづけることである。従って有意差ではなかったにせよ、精子のアクロゾーム膜への影響を考えれば、5~15 mMの低濃度の方が適当であると思われる。

本実験の結果を総合して考えると、ETCG液を基礎として豚精液を5°Cに保存する場合は、カフェインまたはテオフィリン添加の至適濃度は10~15 mMであると考える。

なお、以上の結果からカフェインまたはテオフィリンを添加することにより豚精液を保存する際に精子の活力維持性を高め、また活力検査の際のアナビオーシスからの回復に著しい効果のあることは疑いのないことである。しかしながら、一方、これらメチルキサンチン添加が豚精子のアクロゾーム正常率の低下をもたらす危険性のあることを考えるとき、精子の受精能力に果してどこまで寄与できるかについては、今後正確な授精試験を行って検討することが必要であると考えられる。

擧筆するに当り、稀釈液の処方並びに作製につき御助言を載いた神戸大学農学部加藤征史郎助教授に深謝致します。また実験遂行に当り種々御協力載いた本研究室小島洋一助手に御礼を申し上げます。

引用文献

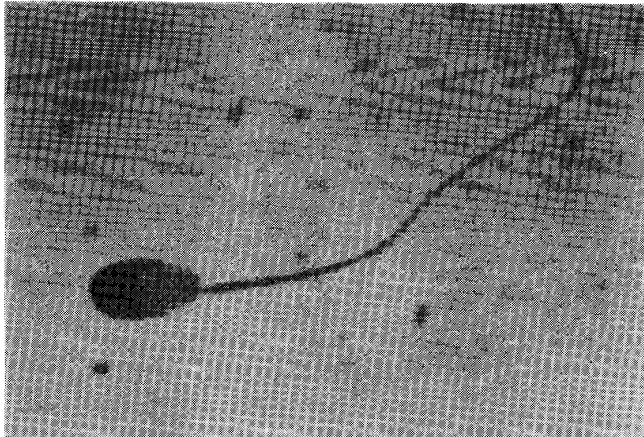
- 1) 伊藤祐之, 丹羽太左衛門, 工藤 篤, 瑞穂 当 (1948): 畜試報告, 55, 17-56.
- 2) 瑞穂 当, ——, 副島昭彦(1960): 農技研報告, G19, 15-24.
- 3) Melrose, D. R. (1972) Factors influencing progress of artificial insemination in pigs. In *Animal Reproduction and Artificial Insemination*. Edizioni, Agricole, Bologna, Italy.
- 4) 阿部 登(1967): 滝川畜試研報, 5, 58-64.
- 5) 糟谷 泰, 河部和雄(1976): 日豚研誌, 13, 103-106.
- 6) 和出 靖, 副島昭彦, 栢田博司(1977): 家畜繁殖誌, 23, 99-104.
- 7) 加藤征史郎, 池上順子, 齊田二郎(1977): 家畜繁殖誌, 25, 120-125.
- 8) Garbers, D. L., W. D. Lust, N. L. First & H. A. Lardy (1971): *Biochemistry*, 10, 1825-1831.
- 9) ——, N. L. First, J. J. Sullivan & H. A. Lardy (1971): *Biol. Reprod.*, 5, 336-339.
- 10) ——, ——, S. K. Gorman & H. A. Lardy (1973); *ibid.*, 8, 599-606.
- 11) 宮本 元, 入谷 明, 西川義正(1973): 凍結研報, 41, 3-6.
- 12) 番場公雄, 小島義夫(1978): 家畜繁殖誌, 24, 100-104.
- 13) 宮本 元, 西川義正(1980): 日畜会報, 51, 272-278.
- 14) 加藤征史郎, 池上順子, 入谷 明(1977): 凍結研報, 51, 8-10.
- 15) 西川義正(1951): 家畜人工授精法, 養賢堂, 東京, p. 99.
- 16) 大沼秀男(1963): 畜試研報, 3, 105-120.
- 17) 白山勝彦(1970): 精子の生存性, 形態, 並びに代謝能に及ぼす温度衝撃の影響, とくに牛精子と豚精子の比較について, 学位論文.
- 18) Hicks, J. J., N. Perdon & A. Rosado (1972): *Fert. Steril.*, 23, 886-893.
- 19) Garbers, D. L., N. L. First & H. A. Lardy (1973): *Biol. Reprod.*, 8, 589-598.
- 20) Frenkel, G., R. N. Peterson & M. Freund (1973): *Proc. Soc. exptl. Biol. Med.*, 144, 1420-1425.
- 21) Hoskins, D. D., M. L. Hall & D. Munsterman (1975): *Biol. Reprod.*, 13, 168-176.
- 22) Fraser, L. R. (1979): *J. Reprod. Fert.*, 57, 377-384.
- 23) Peterson, R. N., D. Seyler, D. Bundman & M. Freund (1979) *ibid.*, 55, 385-390.
- 24) Haesungcharern, A. & M. Chulavatnatol (1973):

- Fert. Steril., 24, 662 - 665.
- 25) Schoenfeld, Cy., R. D. Amelar & L. Duin (1973):
ibid., 24, 772 - 775.
- 26) —, —, — (1975): ibid., 26, 158 - 161.
- 27) Barkay, J., J. H. Zuckerman, D. Sklan & S.
Gordon (1977): ibid., 28, 175 - 177.
- 28) 宮本 元, 田村彰夫, 入谷 明, 西川義正(1973):
凍結研報, 44, 10 - 12.
- 29) Pursel, V. G., L. L. Schulman & L. A. Johnson
(1973): J. Anim. Sci., 37, 785 - 789.
- 30) —, L. A. Johnson & L. L. Schulman (1974):
ibid., 38, 113 - 116.
- 31) Delgado, N. M., L. Haucuja, R. Ma Pancardo,
H. Merchant & A. Rosado (1976): Fert. Steril.,
27, 413 - 420.

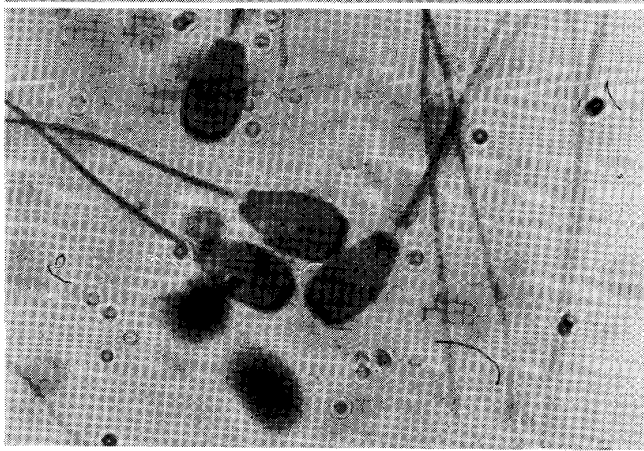
Summar

The effects of caffeine and theophylline on the motility and on the acrosome morphology of boar spermatozoa stored at 5°C were studied. Aliquot of semen were diluted at 30°C with two volumes of ETCG diluents containing 10, 20, 30, 40 mM caffeine or theophylline in Experiment 1, and with those containing 5, 10, 15, 20 mM caffeine or theophylline in Experiment 2. Diluted samples were gradually cooled to 5°C. After storage of the sample for 1 - 5 days at 5°C, sperm motility from anabiosis by incubation at 35°C and acrosome morphology were assessed.

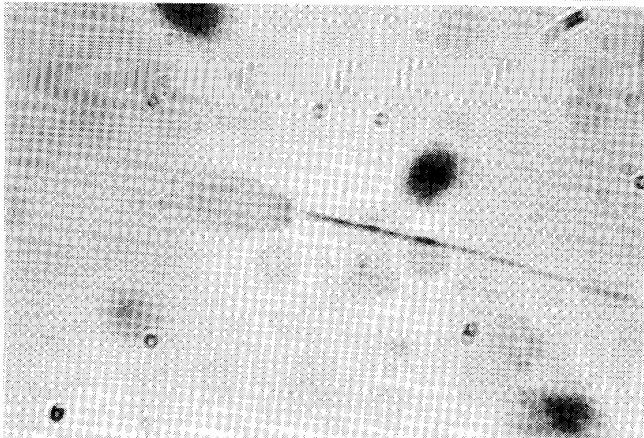
Caffeine and theophylline improved sperm motility markedly during storage at 5°C and shortened the recovery time from anabiosis. In these experimental conditions, 5 - 20 mM caffeine and theophylline recovered motility sooner, while 30 - 40 mM caffeine and theophylline took more time for recovery but maintained high motility longer. On the contrary, addition of caffeine and theophylline seemed to increase acrosome deterioration slightly. The addition of 10 - 15 mM caffeine and theophylline seemed to be most effective in these experimental conditions.



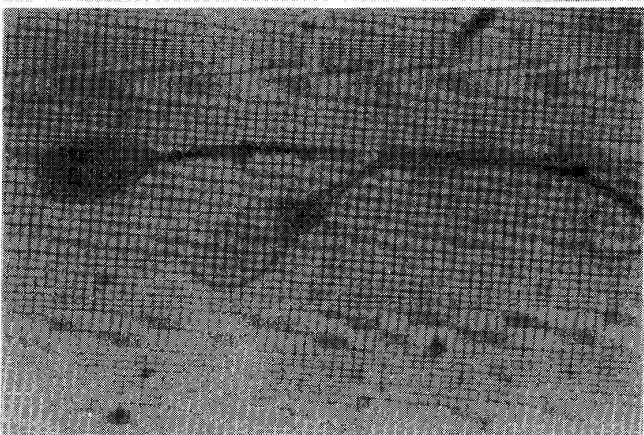
1. Normal acrosomic system



2. Unusual stainability of anterior boundary



3. Swollen acrosomic system



4. Detachment of acrosomic system

Plate. 1. Morphological appearance of acrosomic system.