

ワカサギ精巢精子の冷蔵保存用希釈液の検討

井塚 隆

Diluents for Chilled Storage of Testicular Spermatozoa
in Wakasagi *Hypomesus nipponensis*.

Takashi IZUKA*

Abstract

Two kinds of diluents, artificial seminal plasma of ayu (ASP) and artificial testicular fluid of shishamo smelt (ATF), for chilled storage of testicular spermatozoa of wakasagi *Hypomesus nipponensis* were examined, and following results were obtained.

The spermatozoa have high potential motility in testicular semen of matured fish and motility was influenced by the pH of ASP and ATF. Although testicular spermatozoa exhibited a high motility score (numerical index for evaluation of percentages of motile sperm) in diluents of pH 6.5–8.0, their motility was almost inhibited in pH 8.5–9.5.

The spermatozoa in minced testis exhibited lower motility score than those in testicular semen. When minced testes diluted at 25, 50 and 100 times with ASP and ATF in pH 8.5 were stored in chilled condition (4°C), spermatozoa in all diluents acquired significantly high levels of motility score in the following day and maintained relatively high motility for eleven days. Motility score was greatly reduced in most of the stored samples since 13th day because of the propagation of bacterium. In stored samples without the conspicuous propagation of bacterium, spermatozoa in ASP and ATF became completely inactive on 24th day and 35th day, respectively. The duration of moving spermatozoa went down gradually and pH of minced testes solutions fluctuated between 8.5 and 8.9 during preservation.

Artificial insemination in wakasagi requires plenty of time and labor because the quantity of semen collected by abdominal pressure method is scanty. However, these results mentioned above suggest that testicular semen and chilled solution of minced testis diluted with ASP and ATF are useful for artificial insemination.

緒 言

一般的に、ワカサギ *Hypomesus nipponensis* の産卵場における性比は、産卵初期に雄の割合が高く、その後雌の割合が増加し(岡田・伊藤¹⁾、白石²⁾、鳥澤³⁾)、末期にはふたたび雄が多くなることも観察されている(白石²⁾、鳥澤³⁾)。これは、まず雄が産卵場に遡上来遊し、長期にわたって留まることによって性比が雄に偏るためと考えられている(鳥澤³⁾)。しかしながら、陸上施設において養成親魚から種苗生産をおこなう場合には、産卵盛期から終期にかけて、雄親魚の斃死により必要量の精子を確保することが困難なことがある(岡本他⁴⁾)。さらに、雄親魚一尾から搾出できる精液の量は、例えばニジマス *Oncorhynchus mykiss* が平均4.8±2.57gであるのに対

し(皆川他⁵⁾)、ワカサギでは非常に少なく0.026±0.012gである(井塚、未発表)。これらのことから、種苗生産のためには多くの雄親魚を飼育しなければならないだけでなく、人工受精の際には多くの個体から精液を搾出しなければならないなど、多大な労力が必要とされる。

魚類の精子の保存方法は冷蔵保存と冷凍保存に大別される(宇野他⁶⁾、太田⁷⁾)。冷蔵保存は冷凍保存に比べて、保存期間が約1ヶ月以内と短いものの、技術的・施設的な容易さから、種苗生産の現場には実用的とされており、雌雄の成熟期差の補正や種苗生産作業の効率化などに適している(宇野他⁶⁾、太田⁷⁾)。冷蔵保存技術に関する研究は、淡水魚ではニジマス(宇野他⁶⁾、高橋他⁸⁾)、アマゴ *O. masou ishikawae* (宇野他⁶⁾、太田他⁹⁾)、シシャ

モ *Spirinchus lanceolatus* (太田他¹⁰⁾)、アユ *Plecoglossus altivelis altivelis* (辻他¹¹⁾)などでおこなわれており、種苗生産に実用的な知見もいくつか得られている(高橋他⁹⁾, 太田他¹⁰⁾)。ワカサギについては、岡本他⁹⁾がリング液と家畜精液保存用のGPC-5液を希釈液として精巢懸濁液を保存し、経過時間と発眼率の関係を観察している。しかしながら、保存時間は数時間と短いうえ、精子の運動活性については触れていない。

精子の冷蔵保存では、精液を希釈する溶液の選択が保存効果を左右する最も重要な要因であり(太田他⁹⁾)、また、精子の運動能に関する知見は保存技術の開発に不可欠である(辻他¹¹⁾)。

そこで本研究では、既にイオン組成が明らかにされているアユの精漿(辻他¹¹⁾)とシシャモの精巢液(太田他¹⁰⁾)を参考に希釈液を作製し、ワカサギの精巢精液の冷蔵保存を試みた。そして、保存期間と精巢精子の運動能との関係を明らかにすることにより、各希釈液が本種精液の冷蔵保存に利用できるかを検討した。また、アユの冷蔵保存精液の精子運動活性についても知見を得たので合わせて報告する。

材料および方法

供試サンプル

1997年に諏訪湖より導入したワカサギ発眼卵から、当試験場において継代飼育している当年魚(継代数4)で、腹部を圧迫すると生殖口から精液が放出する成熟雄魚を用いた。実験には精巢精液と精巢懸濁液に含まれる精子を供した。ただし、精巢精液は腹腔から取り出した精巢をハサミにより数カ所切断し、滲出液を採取することとした(太田他¹⁰⁾)。また、精巢懸濁液は精巢をシャーレに置き、ハサミにより細かく切り刻んだものを用いた。採取した精巢精液と精巢懸濁液は直ちに実験に供するようになったが、それまでの間、それぞれ1.5mlマイクロチューブとシャーレに入れて4℃で保管した。

アユについても、当試験場で継代飼育している当年魚(継代数23)の成熟雄魚を用い、前述の方法により精巢懸濁液を作製し試験に供した。

希釈液の調製

精巢精子を保存するための希釈液は、辻他¹¹⁾の報告によるアユの精漿、および太田他¹⁰⁾によるシシャモの精巢液(精巢精液を遠心分離して得られる非細胞成分(太田他注))のイオン組成をもとにそれぞれ調製して用いた(以降、これらをまとめて呼称する場合は「希釈液」とする)。

以下にその成分を記す。

アユ人工精漿: NaCl 115.2mM、KCl 12.8mM、CaCl₂ 1.6mM、MgCl₂ 0.6mM

シシャモ人工精巢液: NaCl 124.3mM、KCl 11.0mM、CaCl₂ 0.7mM、MgCl₂ 0.9mM

さらに、太田他¹⁰⁾、辻他¹¹⁾を参考に、これらの希釈液にNaHCO₃とGood's Buffer (pH6.0~6.5はMES、pH7.0~7.5はHEPES、pH8.0~9.5はTAPS)をそれぞれ20mMず

つ添加し、1N-NaOHでpHを調整した。

運動精子比、精子運動時間、精液pHの測定

精子の運動を観察するための溶液は、蒸留水をHEPES 20mM-NaOHでpH7.5に調整したBuffer solution(以下、BSとする)(辻他¹¹⁾)を用いた。精巢精子をアユ人工精漿およびワカサギ人工精巢液で希釈したもの(以下、保存溶液とする)を、マイクロピペットで3穴スライドグラスに任意量分注し、最終希釈比が1200倍となるようにBSを30μl添加して、鋭利な木片で素早く攪拌した。作業は400倍の光学顕微鏡下でおこない、鏡筒に接続したCCDカメラ(HITACHI CCD color camera)から得た映像をビデオモニター(HITACHI CT-1450)に出力して精子の運動を観察した。運動精子比は太田他¹⁰⁾の方法により、6段階に区分して判定した(Motility Score: 以下MSとする)。つまり、BSで希釈した後に運動する精子の割合が75%以上の場合を「5+」、50~74%を「4+」、25~49%を「3+」、24%以下を「2+」、極めて少数の場合を「1+」、すべて動かない場合を「0」とした。運動精子比の測定は各サンプルにつき3回ずつおこない、最も多く観察されたMS値を記録した。精子の運動時間についても運動精子比と同様に観察した。ただし、観察倍率は200倍とし、BSで精巢精子を希釈攪拌してから、MSが0になるまでの時間を計測した。精巢精液および保存溶液のpHは、それぞれの液をマイクロピペットで20μl採取して、pHメーター(HORIBA B-211)で測定した。

試験1: 希釈液のpHと精子の運動活性

ワカサギの精巢精子を保存する際の希釈液のpHを決定するために、アユ人工精漿とシシャモ人工精巢液のpHが精子の運動活性に及ぼす影響を観察した。ワカサギ5尾(TL=93.2±7.4mm、BW=3.9±0.9g、GSI=3.0±0.6)から精巢精液を採取してpHを測定した。その後、精巢精液0.1μlを3穴スライドグラスに分注し、pH6.0~9.5に調整したアユ人工精漿とシシャモ人工精巢液をそれぞれ30μlずつ添加して攪拌し、運動精子比を測定した。

試験2: 精巢懸濁液の冷蔵保存

ワカサギの精巢懸濁液をアユ人工精漿とシシャモ人工精巢液でそれぞれ25倍、50倍、100倍に希釈して冷蔵保存を試みた。希釈液は試験1により得られた結果から、精子の運動を抑制するのに適したpHに調整した(後述)。25倍希釈区では精巢懸濁液0.2ml、50倍希釈区では0.1ml、100倍希釈区では0.05mlをそれぞれ滅菌したプラスチックシャーレ(60×15mm)に入れ、全量が5mlになるように各希釈液を加えて攪拌したものを保存溶液とした。ただし、1枚のプラスチックシャーレには2尾の成熟雄魚から得られた精巢懸濁液を入れて、これを1セットの保存溶液として、1つの試験区につき3セットの保存溶液を調製し、これらをインキュベーター内において4℃で保存した。また、アユ人工精漿とシシャモ人工精巢液で希釈する精巢懸濁液は、同じ希釈率においては同一個体のものを使用した(Table 1)。その後、定期的に保存溶液からサンプリングし、前述の方法により運動精子

Table 1 Diluents and fish used in chilled storage experiments of testicular spermatozoa of Wakasagi and ayu.
表1 ワカサギとアユの精巢精子の冷蔵保存に使用した希釈液と供試魚

experiment	diluent	concentration	fish			
			number	TL	BW	GSI
Wakashagi						
S-25	ATF* of Shishamo smelt	× 25	6	99.7 ± 8.2	5.1 ± 1.1	4.6 ± 0.7
S-50	do.	× 50	6	98.5 ± 10.6	4.8 ± 1.4	3.4 ± 0.4
S-100	do.	× 100	6	92.7 ± 1.8	4.1 ± 0.3	2.9 ± 1.1
A-25	ASP** of Ayu	× 25	6			
A-50	do.	× 50	6		do.	
A-100	do.	× 100	6			
Ayu						
A-25	ASP of Ayu	× 25	4	167.8 ± 33.5	52.2 ± 10.6	10.3 ± 1.2
A-50	do.	× 50	4		do.	
A-100	do.	× 100	4		do.	

* artificial testicular fluid

** artificial seminal plasma

比、精子運動時間および溶液pHの経日変化をそれぞれ測定して3セットの平均値を算出した。ただし、測定サンプルはインキュベーター内の温度が変わらぬよう、各プラスチックシャーレから素早く30μlずつ96穴丸底マイクロプレートに分注し、測定に供するまで氷冷した発泡スチロールケースで保管した。

アユの精巢懸濁液についても同様な方法で冷蔵保存をおこなったが、希釈液はアユ人工精漿のみを用いた。また、1セットの保存溶液には1尾の成熟雄魚から得られた精巢懸濁液を入れ、1つの試験区につき4セットの保存溶液を作製し(Table 1)、測定は運動精子比のみについておこなった。

結 果

試験1：希釈液のpHと精子の運動活性

実験に供した精巢精液の平均pHは8.3 ± 0.1 (pH8.1~8.5)であり、また、BSで希釈するとほとんど全ての精子が運動し、MSは5+であった。ワカサギ精巢精子の運動精子比と希釈液のpHとの関係をFig.1 に示す。pH 6.0と6.5のシシャモ人工精巢液とアユ人工精漿で希釈したところ、精子の運動開始はほとんど抑制されず、MSはともに5+を示した。pH 7.0~8.5ではpHが高くなるに従って運動精子比が減少し、特にシシャモ人工精巢液において精子の運動が強く抑制される傾向が認められた。pH 8.5における運動精子比は、どちらの希釈液とも1+~2+であった。pH 9.0と9.5では、どちらの希釈液においてもMSが1+であったが、すべての精子の運動を抑制することはできなかった。これら精子の運動開始に対するpHの抑制作用と、精巢精液のpHを考慮し、試験2では希釈液のpHを8.5に調整することとした。

試験2：精巢懸濁液の冷蔵保存

冷蔵保存開始後の経過日数にともなうワカサギとアユ

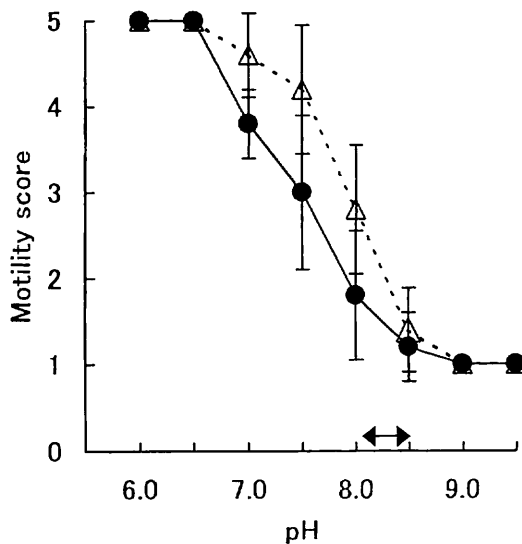


Fig. 1 Effects of changes in pH of diluents on testicular spermatozoa motility of wakashagi. Values are means ± SD of five experiments. ● : artificial testicular fluid of shishamo smelt △ : artificial seminal plasma of ayu Arrows represent pH of testicular semen used.

図1 希釈液のpHがワカサギ精巢精子の運動活性に及ぼす影響

● : シシャモ人工精巢液

△ : アユ人工精漿

矢印は実験に使用した精巢精液のpH範囲を示す

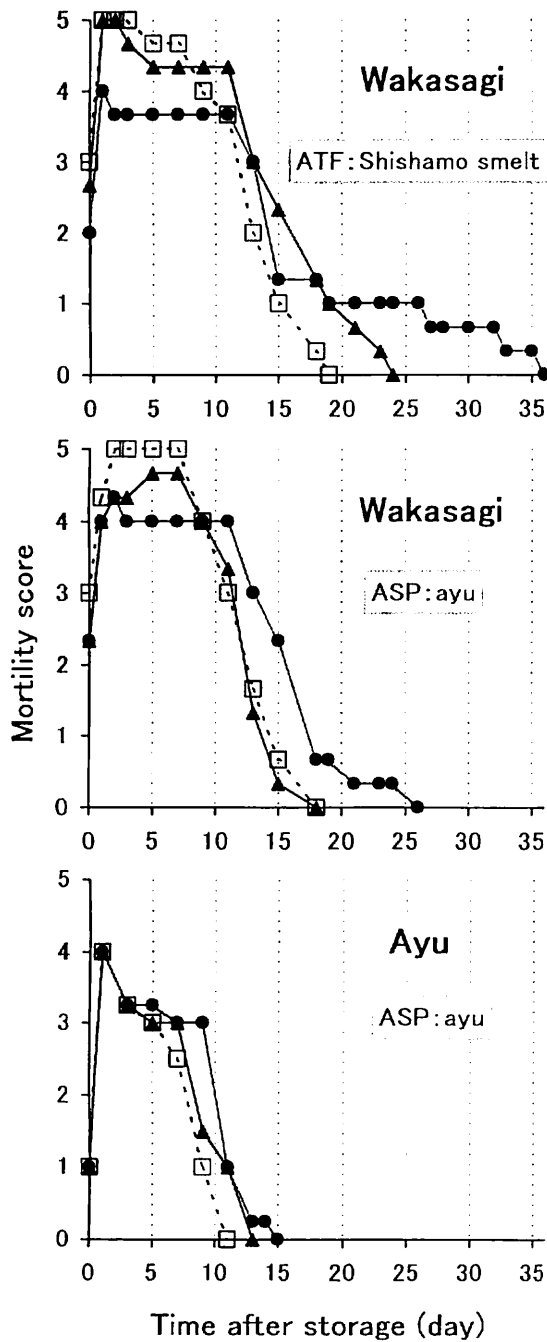


Fig. 2 Patterns of motility score of testicular spermatozoa in wakasagi (upper and middle) and ayu (bottom) after chilled storage. Minced testes were diluted at 25 (●), 50 (▲), and 100 (□) times with artificial testicular fluid of shishamo (upper) and artificial seminal plasma of ayu (middle and bottom). Values are means of three (wakasagi) and four (ayu) experiments, and SD was omitted for clarity.

図2 保存経過日数にともなうワカサギとアユ精巢精子の運動精子比の変化

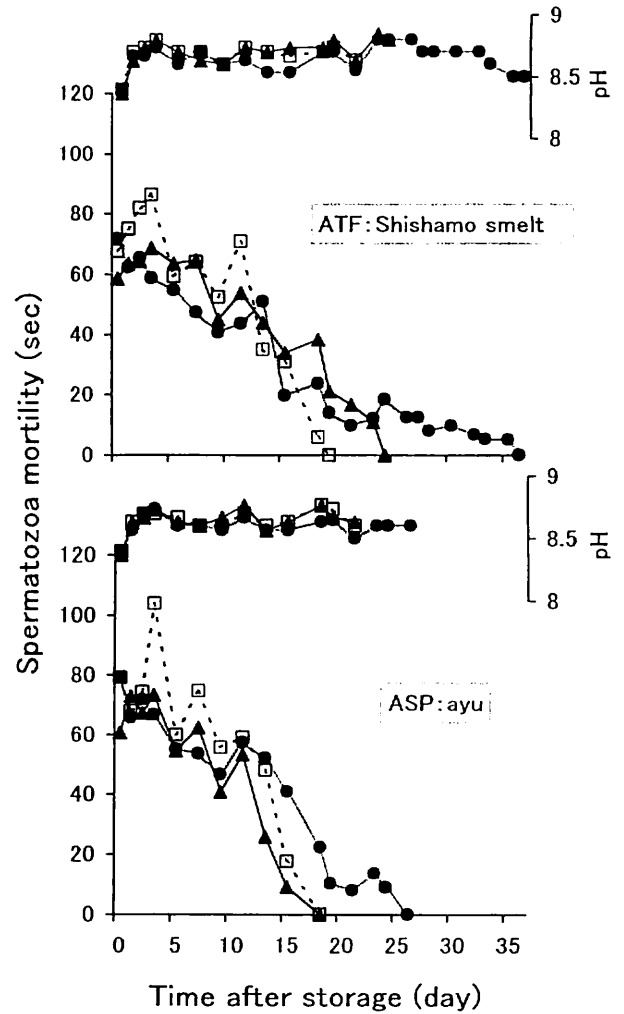


Fig. 3 Patterns of testicular spermatozoa motility of wakasagi and pH of stock solutions after chilled storage. Minced testes were diluted at 25 (●), 50 (▲), and 100 (□) times with artificial testicular fluid of shishamo (upper) and artificial seminal plasma of ayu (lower). Values are means of three experiments, and SD was omitted for clarity.

図3 保存経過日数にともなうワカサギ精巢精子の運動時間と保存溶液pHの変化

精巢精子の運動精子比(MS)の変化をFig.2に示した。実験開始時(保存開始0日目)に、魚体から得た精巢懸濁液中の精巢精子には運動活性が認められ、MSは2+~3+を示した。保存開始1日目には、シシャモ人工精巢液とアユ人工精漿のいずれで希釈した保存溶液においても(以下、それぞれシシャモ人工精巢液区、アユ人工精漿区とする)、MSが向上して4+~5+を示した。特にシシャモ人工精巢液区の100倍希釈区はMSが3日目まで5+、アユ人工精漿区の100倍希釈区はMSが7日目まで5+であっ

た。その後、いずれの保存溶液においても、MSは横遣いもしくは緩やかに低下したが、シシャモ人工精巢液区の11日目ではMSが4+前後を、アユ人工精巢液区でMSが3+~4+を示した。13日目には、25倍希釈区のそれぞれ1セットずつを除き、保存溶液中に細菌が繁殖し、その後、保存溶液が黄白色に変わるものやゲル化するものが観察され、運動精子比は顕著に低下した。細菌の繁殖がほとんど認められなかった25倍希釈区の保存溶液では、シシャモ人工精巢液区で35日目まで、アユ人工精巢液区で24日目まで精子の運動活性が認められた。

一方、アユでは、魚体から取り出した直後の精巢懸濁液中の精巢精子は、ほとんど活性が認められずMSが1+であった。保存開始1日目には、全ての保存溶液でMSが向上して4+を示したが、その後、緩やかに低下し、7~9日目以降は顕著に低下した。

ワカサギの精巢精子の運動時間と保存溶液のpHの変化をFig.3に示した。シシャモ人工精巢液区では実験開始時に精子の平均運動時間が59~72秒、アユ人工精巢液区では61~79秒であった。その後、どの保存溶液においても多少の増減が見られたものの、保存経過日数とともに精子の運動時間は低下した。最長運動時間は、100倍希釈区の3日目では認められ、シシャモ人工精巢液区で86±13秒、アユ人工精巢液区で104±14秒であった。pHはいずれの保存溶液においても、実験開始0日目に8.4を示したが、その後、シシャモ人工精巢液区ではpH 8.5~8.9、アユ人工精巢液区ではpH 8.5~8.8の間で推移した。

考 察

辻他¹³⁾によると、これまでの研究では、希釈液の低いpH環境は精子の運動開始に抑制的に働くことが知られていたが、アユではpH 7.0以上で精子の運動が抑制され、酸性に傾くことにより運動が開始されるため、極めて興味深いと報告している。本研究でも、各希釈液で希釈したワカサギの精巢精子は、pH 6.5以下の酸性で運動活性が高く、アルカリ性に傾くことにより運動が抑制された。輸精管内精子を用いた場合にも同様な傾向が得られており(井塚、未発表)、ワカサギ精子の運動活性とpH変動との関連性においてアユとの類似性が明らかになった。一方、pH 9.0以上の希釈液で精巢精子を希釈しても、MSが1+を示し、全ての運動を抑制することはできなかった。辻他¹³⁾はアユの精漿とそのイオン組成から作製した人工精漿でアユの精子を希釈した場合、どちらにおいても運動する精子が低率で認められ、抑制作用に対する反応性が個々の精子で異なるとしている。同様の現象はシシャモにおいても知られている(太田他¹⁰⁾)。このことから、本研究ではワカサギ精巢精子の希釈液としてシシャモ人工精巢液とアユ人工精漿を用いたが、精子の運動開始をほとんど抑制できるという点では、応用可能であると思われる。ただし、太田他¹⁰⁾はシシャモ人工精巢液のKCl濃度を高めることにより、ほぼすべての精子の運動開始を抑制できると報告しているため、今後、ワカサギの精巢精子においてもその有効性を検討したい。

ワカサギの精巢懸濁液中の精子はMSが2+~3+で、半数以下の精子に運動活性が認められたが、精巢精液ではほとんどの精子が運動活性を有していた(MS=5+)。これは、本種の精巢精子がすでに運動能を獲得しており、特に、切断により染み出てくる精巢精液中の精子において顕著であることを示すものである。同じキュウリウオ科のシシャモでも、精巢精液中の精子は運動活性を有し、輸精管内精液中の精子とは運動比と運動時間において有意差は認められていない(太田他¹⁰⁾)。一方、サケ科魚類の精子は、精巢内では運動能を獲得しておらず、輸精管の精漿中で付与されることが知られる(森沢・森沢¹²⁾)。本研究のアユにおいても、精巢精子はMSが1+でほとんど運動しないことが認められた。

精巢精子が運動能を有しているシシャモでは、精巢懸濁液が人工受精に利用できることが報告されている(太田他¹⁰⁾)。また、岡本他¹⁴⁾は精子の運動活性には言及していないものの、ワカサギの精巢懸濁液が人工受精に利用可能であることを報告している。前述のように、本研究ではワカサギの精巢精子が運動活性をすでに有していることが明らかになった。これらのことから、本種の種苗生産では、精巢懸濁液や、特に運動精子比の高い精巢精液を人工受精に用いることにより、少ない搾出精液を補うことが可能となり、飼育・受精作業の効率化に繋がるものと思われる。一方、搾出精液が充分量得られないドジョウでは精巢をリンゲル液中で細断して精子懸濁液を作製し、これを媒精に使用する(久保田¹⁵⁾、野村¹⁶⁾)。このように、採精量の少ない種では、精液を希釈して限られた量の精液を有効に使用することが望ましい(太田他¹⁰⁾)。本研究では、ワカサギの精巢懸濁液をアユ人工精漿とシシャモ人工精巢液で希釈・保存したところ、翌日にはいずれの希釈液においても運動精子比の向上が観察された。これは、運動活性をまだ有していない精巢精子が、希釈液中で運動能を獲得したものと解される。精子の運動能と受精能は相関すると考えられることから(太田ら¹⁰⁾、辻他¹³⁾)、今後、精巢懸濁液を希釈液で短期間保存したのについて、精子の運動活性と受精率・ふ化率の関係を明らかにし、人工受精における短期保存精子の有用性を検討する必要がある。

岡本他¹⁴⁾は、ワカサギの精巢懸濁液を家畜精液の保存に用いられるGPC-5液とリンゲル液で希釈して、その保存性を検討しており、GPC-5液による精巢精子は3時間まで高い受精能を有することを認めている。本研究では、精巢精子が保存開始後10日前後は比較的高い運動活性を保持していた。これらのことから、シシャモ人工精巢液とアユ人工精漿は、ワカサギの精巢精子を保存するための希釈液として充分利用可能なことと思われるが、今後、保存精巢精子を用いた人工受精により、保存期間と精子の受精能との関係を明らかにする必要がある。一方、保存開始13日目以降は、多くの保存溶液において精子の運動活性が顕著に低下した。精子の運動活性を保つには保存溶液の好適なpH域があり(Ohta and Tsuji¹⁷⁾)、大きなpH変化は精子の運動活性に影響を及ぼすものと考

えられている(宇野他⁹⁾)。しかしながら本研究では、保存溶液のpHはどれも8.5以上を維持しており、大きな変動は認められなかったことから、13日目以降に見られた細菌の繁殖が精子の運動活性に影響を与えたものと考えられる。細菌の繁殖による精子運動活性の低下・消失は、サケ(広井他¹⁷⁾)、クロダイ(栩野¹⁸⁾)、サワラ(栩野¹⁹⁾)においても報告されている。これらのことから、本研究で25倍希釈区において保存期間の延長が認められたのは、溶液中に細菌が繁殖しなかったことによるものと考えられる。この点について、保存溶液にペニシリンとストレプトマイシン(宇野他⁹⁾)、ゲンタマイシン(栩野¹⁸⁾)などの抗生物質を添加して、細菌の繁殖を抑制する試みがなされている。数日にわたる精子の運動活性保持期間の延長が認められているが(栩野^{18,19)})、無菌操作などにより継続的に細菌の繁殖を抑制する必要性も指摘されている(宇野他⁹⁾)、高橋他⁹⁾)。今後は、これらの制菌に関する技術も利用することにより、ワカサギ精巢精子の冷蔵保存期間の延長を図るとともに、希釈率と保存性についても更なる検討を加えることとしたい。

謝 辞

佐藤茂場長、原日出夫主任研究員には有益な助言を、奥村守氏には実験魚の飼育管理をしていただき、深謝申し上げます。また、故江成節子氏には飼育管理や実験作業において有り余るほどの支援をいただいた。氏の存在なきにして本研究は成し遂げられなかったことをここに記し、心から御礼申し上げます。

引用文献

- 岡田 雋・伊藤小四郎(1960)：石狩古川産ワカサギ魚群の生態研究 1. 忠海漁場附近における産卵期の生態。水産孵化場研究報告，第15号，20-40。
- 白石芳一(1961)：ワカサギの水産生物学的ならびに資源学的研究。淡水区水産研究所研究報告，第10巻，第3号，1-263。
- 鳥澤 雅(1999)：網走湖産ワカサギの生活史多型分岐と資源変動機構。北海道立水産試験場研究報告，第56号，1-117。
- 岡本成司・河崎 正・高野 誠(1982)：ワカサギの人工種苗生産技術の開発に関する研究－Ⅲ GPC-5 精巢懸濁液による人工受精について。茨城県内水面試験場調査研究報告，No.19，38-43。
- 皆川 恵・酒井 清・隆島史夫(1986)：ニジマス精液の性状について。水産増殖，34(3)，199-200。
- 宇野将義・井野川伸男・黒倉 寿(1986)：ニジマス・アマゴの人工受精への保存精液の利用－Ⅰ 液状保存精液の精子活力と受精能力。水産増殖，34巻2号，107-111。
- 太田博巳(1992)：精子の凍結保存と精子活性。養殖研ニュース，No.24，2-5。
- 高橋一孝・猪田利夫・森沢正昭(1987)：ニジマス精子の簡便な保存方法。養殖，1月号，101-105。
- 太田博巳・鶴沼辰哉・名古屋博之(2000)：アマゴ精子の冷蔵保存用希釈液と媒精溶液の検討。Nippon Suisan Gakkaishi，66(1)，88-96。
- 太田博巳・楠田 聡・工藤 智(1995)：シシヤモ精巢精子の運動活性。Nippon Suisan Gakkaishi，61(1)，7-12。
- 辻 将治・池田和夫・太田博巳(2000)：アユ精子の運動開始を導くイオン環境の変化。Nippon Suisan Gakkaishi，66(1)，55-61。
- 森沢正昭・森沢幸子(1994)：精子運動の調節。精子学，毛利秀雄監修，森沢正昭・星 元紀編。東京大学出版会，東京，pp104-120。
- 久保田善二郎(1967)：ドジョウ。養魚学各論。川本信之編。恒星社厚生閣，東京，pp252-278。
- 野村 稔(1982)：ドジョウ。淡水養殖技術。野村 稔編。恒星社厚生閣，東京，pp242-247。
- 太田博巳・松原孝博・今田和史(1989)：体腔液及び洗卵液で希釈されたサクラマス精子の運動について。水産増殖，37巻4号，235-239。
- Ohta, H and M. Tsuji(1998)：Ionic environment necessary for maintenance of potential motility in the common carp spermatozoa during in vitro storage. Fisheries Science 64 (4)，547- 552。
- 広井 修・安川雅夫・末武敏夫(1973)：サケ・マス魚類の卵および精子の保存に関する研究－2 サケ(*Oncorhynchus keta*)精子の保存について。北海道さけ・ますふ化場研究報告，第27号，39-44。
- 栩野元秀(1988)：クロダイ精液の液状保存。昭和62年度 香川県水産試験場事業報告，120-122。
- 栩野元秀(2001)：サワラ等中間育成技術開発事業サワラ精液の液状保存。香川県水産試験場事業報告，平成11年度，108-113。