

소혈청알부민과 糖類가 돼지 凍結精자의 生存性 및 頭帽形態에 미치는 影響

尹鍾澤 · 任京淳 · 李用斌

서울대학교 農科大學

Effects of Bovine Serum Albumin and Sugars on Sperm Livability and Acrosome Morphology of Frozen-thawed Boar Semen

Yoon, J. T., K. S. Im and Y. B. Lee

College of Agriculture, Seoul National University

Summary

This experiment was carried out to investigate the effect of bovine serum albumin (BSA), sugars, glycerol equilibration time, straw size and thawing method on the survival index and the morphology of frozen boar spermatozoa. The results obtained were summarized as follow:

1. When the semen frozen in BF5 dilutor as pellet form was thawed in BTS at 37° and 50°C, BF5 dilutor with fructose showed higher sperm survival index than that with dextrose, however, when the semen was thawed on dry test tube at 37°C, BF5 dilutor with sucrose showed higher sperm survival index than with other sugars.
2. When the semen frozen in BF5 dilutor with straw and thawed at 37°C, BF5 dilutor with dextrose showed higher sperm survival index than those with other sugars, and there was no difference in sperm survival index between 0.5 and 1.0 ml straws.
3. The sperm survival index of frozen sperm was significantly ($P<0.05$) improved due to addition of BSA (0.05%) to BF5 dilutor.
4. When the extended semen with BF5 dilutor containing 0.01 to 0.05% of BSA was frozen in the straw, the semen without glycerol equilibration showed significantly ($P<0.05$) higher sperm survival index than those with 2, 4 and 6 hrs glycerol equilibration time.
5. The sperm frozen in BF5 dilutor with dextrose or fructose, sucrose and raffinose showed 77 to 88% in normal acrosome rate and no difference among sugars.
6. The frozen semen showed lower normal acrosome rate than the first and second diluted semen, whereas the frozen semen showed higher swollen, damaged and missing acrosome rate than the first and second diluted semen.
7. Damaged and missing acrosome rate of sperm head due to freezing was somewhat inhibited by addition of BSA (0.01 to 0.05) to the BF5 dilutor.

I. 緒 論

哺乳動物의 精子를 凍結保存하려는 研究는 1949년 Polge등에 의하여 精子의 耐凍效果가 발표되고 이후 Polge와 Rowson(1952)에 의하여 -79°C 에서 凍結한 精子로 受胎가 이루어짐에 따라 活發히 進行되었다. 돼지 精子는 소 精子보다 耐凍性이 약하며(Polge, 1956), 凍結融解하면 精子의 頭帽에 異常率이 높아지는 것으로(橋爪, 1976; Potter, 1979) 보고되고 있다.

本研究는 돼지 凍結精液 製造에 있어서 소 血清 알부민과 糖類添加가 精子의 生存性과 頭帽形態에 미치는 影響을 究明하기 위하여 實施하였다.

II. 材料 및 方法

1. 供試種牡豚

서울大學校 農科大學 附屬實驗牧場에서 飼育하고 있는 Yorkshire, Landrace, Duroc 및 Hampshire 種牡豚 각 1頭計 4頭가 供試되었다.

2. 稀釋液

Tes-N-Tris (hydroxymethyl) methyl-2-aminomethane sulfonic acid 1.2g, Tris(hydroxymethyl) amino-methane 0.2g, Dextrose 3.2g, 卵黃20ml 및 Orvus es paste 0.5ml을 蒸留水로 100ml되게 조정한 Pursel등(1975)의 Beltsville F5 (BF5)液에 소 血清 알부민과 糖類를 첨가하였다. 稀釋液은 1,500rpm으로 1時間 遠心分離하여 上澄液만 使用하였다.

3. 精液의 稀釋 및 處理

手匠法에 의하여 分離採取한 濃厚精液을 2時間 室溫에 靜置한 후 시험관에 原精液을 5ml 넣고 1,500rpm으로 3分間 遠心分離하여 上澄液을 除去하고 1次稀釋液 5ml로 浮遊하였다. 1次稀釋精液을 약 200ml의 물이 담긴 비커에 옮겨 冷蔵庫에 2時間 靜置하여 5°C 로 냉각하였다. 2% 글리세롤을 함유한 2次稀釋液을 同量 서서히 첨가하여 글리세롤의 最終濃度を 1%, 最終精子數를 약 $2 \times 10^8/\text{ml}$ 로 하였다.

4. 凍結 및 融解

2次稀釋液 0.2ml을 드라이 아이스위에 滴下하여 3分間 凍結하였다. 또 다른 방법으로 2次稀釋精液을 0.5와 1.0ml 스트로에 각각 分注하고 이 스트로를 液體室素上面 5cm위에 10分間 靜置하여 豫備凍結후 液體室素중에 浸漬하였다.

錠劑化한 凍結精液은 37° 및 50°C 에 加熱한 Pursel등(1975)의 Beltsville 融解液(BTS) 10ml(Dextrose 3.7g, Sodium citrate dihydrate 0.6g, Sodium bicarbonate 0.125g, Disodium ethylenediamine tetraacetate 0.125g, Potassium chloride 0.075g을 증류수로 100ml되게 조정한것)에 滴下하여 溶해하거나 직접 시험관속에 넣고 시험관을 37°C 의 水槽에 담가 溶해하였다. 스트로 凍結精液은 스트로를 직접 37°C 의 水槽에서 20~30秒간 融解하였다.

5. 生存指數

38°C 슬라이드 加溫板위에 놓인 精液檢査板에 精液을 滴下시킨후 커버글라스를 덮고 215배로 鏡檢하여 精子의 生存率과 活力을 同時에 檢査하고 生存指數表에 따라 生存指數로 換算하였다.

6. 頭帽의 染色

Hancock-大沼(1963)法에 따라 슬라이드 글라스 위에 1~2방울의 精液을 떨어뜨려 塗抹乾燥하였다. 이 슬라이드 글라스를 固定液에 1시간 담근 후 꺼내어 조심스럽게 流水로 洗滌하고 乾燥하였다. 乾燥된 슬라이드 글라스를 Giemsa染色液에 10시간 정도 담근 후 流水로 조심스럽게 씻어 乾燥하였다. 1,000배로 鏡檢하여 頭帽를 正常, 膨化, 破損으로 分類하였다.

III. 結果 및 考察

1. 凍結融解가 精子의 生存性에 미치는 影響

BF5液의 組成中 dextrose 3.2g/100ml을 fructose, sucrose 혹은 raffinose 각 3.2g/100ml로 대체한 BF5液으로 精液을 稀釋하여 錠劑化 凍結精液을 만든 다음 37° 와 50°C 의 BTS液에 融解하거나 37°C 의 건조 시험관에서 溶해한 精子의 平均生存指數는 fructose가 16.9로 dextrose 10.2, sucrose 11.4 및 raffinose 9.2 보다 有意($p < 0.05$)하게 높았으며 건조 시험관 溶해가 16.4로 融解液에서 37°C 融解 8.6 및 50°C 融解 10.8보다 有意($p < 0.05$)

Table 1. Effect of sugar and thawing method on sperm survival index of semen frozen by pellet method.

(n= 4)

Thawing Temperature(°C)	Dextrose	Fructose	Sucrose	Raffinose	Mean
37*	8.1	22.3	2.1	1.9	8.6b
50*	13.1	25.5	2.5	2.1	10.8b
37**	9.4	2.9	29.5	23.6	16.4a
Mean	10.2b	16.9a	11.4b	9.2b	

* : Thawed in thawing solution, ** : Thawed in dry tube

There are no significant difference(P<0.05) between the same letters.

하게 높았다. 한편 精子的 生存指數는 融解液내에서 녹힌것은 37°와 50°C 모두 raffinose가 다른 糖보다 높았으나 37°C의 건조시험관에서 녹힌 것은 sucrose가 다른 糖 보다 높아 融解方法에 따라서 生存성에 미치는 糖의 효과가 다를 것을 示唆한다. Salamon 등(1973)과 Wilmot 등(1977)은 凍結融解한 精자의 生存性은 凍害防止劑

로서 fructose나 glucose을 稀釋液에 첨가하였을 때 Osinowo 등(1976)은 건조 시험관 融解 보다는 融解液에서의 融解가 더 좋은 生存率을 얻었다고 보고 하였다.

Table 1에서 사용한 稀釋精液을 0.5와 1.0ml의 스트로에 넣어 液體室素에서 급속동결한 후 37°C에 融解한 精자의 生存指數는 Table 2와 같다. 融解후

Table 2. Effect of sugar and straw size on sperm survival index of semen frozen by straw method.

(n= 4)

Straw size	Dextrose	Fructose	Sucrose	Raffinose	Mean
0.5	31.8	3.6	26.7	21.1	20.8a
1.0	31.0	2.7	25.3	22.0	20.3a
Mean	31.4a	3.2d	26.0b	21.6c	20.5

There are no significant difference(P<0.05) between the same letters.

精자의 平均生存指數는 dextrose 31.4, fructose 3.2, sucrose 26.0 및 raffinose 21.6으로 稀釋液중의 糖의 種類間에 有意한(p<0.05) 差가 認定되었으며 dextrose를 첨가한 稀釋液에서 가장 높은 精자의 生存率을 얻었다. 또한 融解후의 精자의 平均生存指數는 0.5ml 스트로가 20.8, 1.0ml 스트로가 20.3으로 스트로 크기간에 差異가 없었다. 副島 등(1983)은 0.25, 0.5, 1.0 및 4.0ml 스트로의 경우 0.5와 1ml의 스트로가 凍結融解후의 精자의 生存性이 良好하였으나 鄭(1977)은 0.5ml 스트로가 1ml 스트로보다 양호하였다고 보고하였다.

소 혈청 알부민(bovine serum albumin, BSA) 을 0.01, 0.05 및 1.0% 첨가한 BF 5液의 稀釋精液을 0.5와 1.0ml의 스트로에서 凍結融解한 精자의 生存指數는 Table 3과 같다. 凍結融解후 精자의 平均生存指數는 BSA 0.01 0.05 및 0.1%가 각각 31.5 34.3, 38.0 및 31.7%로 BSA 0.05%가 0.0, 0.01 및 0.1% 보다 有意(p<0.05)하게 높았다. 즉 소 受精卵 凍結時 卵자의 浮遊液에 첨가하는 소 血清알부민을 돼지의 凍結保存液인 BF 5液에 0.05% 添加하였을 때 凍結融解한 돼지精자의 耐凍性을 높이는 效果가 있음이 認定되었다. 소 혈청알부민이 凍

Table 3. Effect of concentration of bovine serum albumin and straw size on sperm survival index of semen frozen by thraw method

(n=4)

Straw size(ml)	Concentration of bovine serum albumin(%)				Mean
	0.0	0.01	0.05	0.1	
0.5	31.9	33.8	37.5	32.3	33.9a
1.0	31.0	34.7	38.5	31.1	33.8a
Mean	31.5a	34.3a	38.0b	31.7a	33.9

There are no significant difference ($P < 0.01$) between the same letters.

結過程에 어떻게 돼지 精子에 耐凍性を 부여하는지에 관하여는 알수가 없으나 소 血清알부민은 卵子에 대하여는 卵黃膜을 定定시키고 培養液내 존재하는 金屬이온을 安定시키는 것으로 示唆하고 있다 (Whittingham, 1971). 한편 凍結融解후 精子의 生存指數는 스트로의 크기 0.5와 1ml간에 有意差가 없었다.

副島등(1983)과 川倉등(1984)은 融解후 精子의 生存性は 錠劑化 凍結法이 銀薄봉투나 스트로 凍結法 보다 높았다고 보고하고 있다.

BSA濃度, 글리세롤平衡時間 및 스트로의 크기

에 따른 凍結精子의 生存指數는 Table 4와 같다. 凍結融解후 精子의 平均 生存指數는 BSA 0.0, 0.01 및 0.05%가 각각 24.73, 29.11 및 30.58로 添加區가 無添加區 보다 有意 ($p < 0.05$)하게 높았으며 0.01과 0.05%間에는 有意差가 없었다. 한편 글리세롤平衡時間에 따른 凍結融解후의 精子의 平均生存指數는 平衡直後, 2, 4 및 6時間이 각각 34.85, 28.95, 25.71 및 23.04로 平衡直後가 平衡 2, 4 및 6時間보다 有意 ($p < 0.05$)하게 높았다 즉 BSA를 0.01~0.05% 添加한 BF 5液의 稀釋精液을 스트로凍結할 때 글리세롤 平衡은 必要없는 것으로 示唆된다.

Table 4. Effect of concentration of BSA, glycerol equilibration time and size of straw on sperm survival index of semen.

(n=4)

Glycerol equ. (h)	Straw size (ml)	Concentration of bovine serum albumin(%)				Mean
		0	0.01	0.05		
0	0.5	32.05	33.43	38.45	34.64	
	1.0	30.23	36.08	38.85	35.05	
	Mean	31.14	34.75	38.65	34.85a	
2	0.1	25.73	27.88	32.82	28.81	
	1.0	26.70	30.43	30.15	29.09	
	Mean	26.21	29.15	31.49	28.95b	
4	0.5	19.80	25.42	27.30	24.18	
	1.0	24.45	28.23	29.08	27.25	
	Mean	22.13	26.83	28.19	25.71c	
6	0.5	19.08	27.30	25.95	24.11	
	1.0	19.80	24.15	21.98	21.98	
	Mean	19.44	25.33	23.96	23.04c	
Overall Mean	Mean	24.73b	29.11a	30.58a		

There are no significant difference ($P < 0.05$) between the same letters

凍結融解후의 精子的 生存指數는 Pursel등(1975)은 平衡直後가 Wilmut등(1973)은 平衡時間이 짧을 수록 좋다고 하였으나 Niwa등(1962)은 6時間, Dukelow등(1962)은 4時間, Vesser등(1974)은 2時間, 鄭등(1977)은 4時間이 좋았다고 報告하고 있다.

2. 凍結融解가 精자의 頭帽形態에 미치는 影響
BF 5液의 成分中 dextrose(3.2g/100ml)을 각각 3.2g/100ml의 fructose, sucrose 및 raffinose로 代置한 稀釋精液을 錠劑化凍結후 37℃의 BTS液에 融解한 精자의 頭帽形態는 Table 5와 같다. 正常頭帽

Table 5. Effect of sugar on acrosome morphology of boar spermatozoa frozen by pellet method. (n=4)

Sugar	Normal (%)	Swollen (%)	Damaged (%)	Missing (%)
Dextrose	80.8	5.3	10.5	3.0
Fructose	80.5	3.8	10.8	4.5
Sucrose	77.5	9.3	10.3	3.0
Raffinose	81.8	3.5	10.5	4.3
Mean	80.2	5.5	10.5	3.7

의 比率는 dextrose, fructose, sucrose 및 raffinose區가 각각 80.8, 80.5, 77.5 및 81.8%로 糖類間에 差異가 없었다. 한편 異常精자의 比率(膨大, 損傷 및 頭部損失精子 포함)도 糖類間에 差異가 없었다. 따라서 BF 5液의 成分中 dextrose를 fructose, sucrose 혹은 raffinose로 代치하여도 凍結融解后 精子頭帽의 異常率에는 差異가 없다는 것이 밝혀졌다.

廣野(1976)와 加藤(1976)는 凍結融解한 精자의 正常頭帽의 比率는 20과 19%, Pursel등(1978)은 58%, Johnson등(1981)은 53%라고 報告하였는데 본

實驗의 77-88%와는 큰 差異가 있다. Pursel등(1971, 1972)은 精자에 低温衝擊을 가했을 때 精자의 正常頭帽의 比率는 凍害防止物質로서 raffinose, lactose 및 sucrose가 glucose와 fructose보다 높았다고 하였다. 한편 Wilmut 등(1977)은 凍結融解精자의 正常頭帽의 比率는 fructose와 glucose를 凍害防止劑로 사용하였을 때 높았으며 salamon 등(1973)은 raffinose, fructose 및 glucose間에 差異가 없었다고 報告하였다.

凍結過程이 精子形態에 미치는 影響은 Table 6과 같다. 1次稀釋, 2次稀釋 및 凍結融解후의 精子頭

Table 6. Effect of processing method on acrosome morphology of boar spermatozoa (n=16)

Processing method	Normal (%)	Swollen (%)	Damaged (%)	Missing (%)
First dilution	86.2	3.4	8.6	2.0
Second dilution	83.7	5.2	9.5	2.3
Postthawing	79.2	6.3	10.7	3.6

帽의 正常比率는 86.2, 87.7 및 79.2%, 膨化比率는 3.4, 5.2 및 6.3%, 破損比率는 8.6, 9.5 및 10.7% 그리고 缺損比率는 2.0, 2.3 및 3.6%로 凍結過程이 進行됨에 따라 精子頭帽의 正常比率는 減

少하였으며 膨化, 破損 및 缺損比率는 모두 增加하였으며 減少와 增加 比率는 1次와 2次 稀釋精子보다는 凍結融解精子에서 높았다.

橋爪등(1976)도 精子頭帽의 異常比率는 凍結精液

이 原精液 및 1次稀釋液 보다 현저하게 높았다고 報告하였다. 그러나 Potter 등 (1977)은 돼지 精子의 正常頭帽의 比率은 1次稀釋후가 87.2%, 2次稀釋후가 38.3%, 融解후가 8.5%로 凍結過程이 進行됨에 따라 현저하게 減少하였다고 報告하였다. BSA 添加水準이 凍結融解精子의 頭帽形態에 미치는 影響은 Table 7 과 같다. BSA 添加水準 0.00, 0.01 및 0.05%의 頭帽의 正常比率은 81.4, 81.5%로 BSA

添加水準間에 差異가 없었으나 膨化 比率은 5.3, 6.4 및 8.6%로 BSA 添加水準이 增加함에 따라 增加하였다. 한편 破損比率은 각각 10.4, 8.6 및 7.7%, 缺損比率은 3.2, 3.7 및 2.3%로 BSA 添加水準이 增加함에 따라 減少하였다. 따라서 BF 5 液에 BSA 를 0.01~0.05% 添加하면 凍結에 의한 精子頭帽의 破損 및 缺損率이 어느程度 防止되는 것으로 示唆된다.

Table 7. Effect of concentration of BSA on acrosome morphology of frozen boar spermatozoa (n=16)

BSA (%)	Normal (%)	Swollen (%)	Damaged (%)	Missing (%)
0.00	81.4	5.3	10.4	3.2
0.01	81.5	6.4	8.6	3.7
0.05	81.5	8.6	7.7	2.3

IV. 摘 要

本試驗은 돼지의 凍結精液製造에 있어서 소 血清 알부민(BSA) 및 糖類의 添加와 글리세롤 平衡時間, 스트로의 크기 및 融解方法이 精子의 生存性과 頭帽의 形態에 미치는 影響을 檢討하기 위하여 실시하였다. 얻어진 結果는 다음과 같다.

1. 錠劑化 凍結精液내에 있어서 BTS液에서 37°와 50°C에 融解한 精子의 生存指數는 BF5 成分중 dextrose를 fructose로 代置한 稀釋液에서 높았으나 37°C의 건조 試驗管에서 融解한 精子의 生存指數는 sucrose로 代치한 稀釋液에서 높았다.

2. 스트로凍結精液을 37°C의 水槽에서 融解한 精子의 生存指數는 dextrose를 함유한 稀釋液에서 높았고 스트로의 크기 0.5와 1.0ml間에는 차이가 없었다.

3. BF 5 液에 소 血清알부민 0.05%를 添加하므로 融解후 精子의 生存性이 有意(p<0.05)하게 向上되었다.

4. BSA 0.01~0.05%를 함유한 BF 5의 稀釋精液을 스트로에 넣어 凍結했을 때 融解후의 精子의 生存指數는 平衡直후가 2, 4 및 6時間 보다 有意(p<0.01)하게 높았다.

5. BF 5 液의 成分中 dextrose를 fructose, su-

crose 혹은 raffinose로 代치한 保存液의 稀釋精液에 있어서 凍結融解후 精子의 正常頭帽의 比率은 77~88%로 糖類間에 差異가 없었다.

6. 凍結過程이 進行됨에 따라 精子頭帽의 正常比率은 減少하였으며 膨化, 破損 및 缺損比率은 增加하였다.

7. BF 5 稀釋液에 BSA를 0.01~0.05% 添加하므로서 凍結에 의한 精子頭帽의 破損 및 缺損比率이 다소 防止되었다.

REFERENCES

1. Dukelow, W.R. and E.F. Graham. 1962. Freezing of porcine semen. J. Anim. Sci., 21:1020.
2. Johnson, C.E., J.G. Aalbers, C.M.T. Willems and W. Sybesma. 1981. Use of boar spermatozoa for artificial insemination: I. Fertilizing capacity of fresh and frozen spermatozoa in sows on 36 farms. J. Anim. Sci. 52:1130.
3. Niwa, F., R.J. Garrits, and E.F. Graham. 1962. Deep freezing of boar semen. J. Anim. Sci., 21:1027.

4. Osinowo, O. and S. Salamon. 1976. Examination of some processing methods for freezing boar semen. *Aust. J. Biol. Sci.*, 29:325.
5. Polge, C., A.U. Smith and A.S. Parkes. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature (London)* 164:666.
6. Polge, C., and L.E.A. Rowson. 1952. Results with bull semen stored at -79°C . *Vet. Rec.* 64:851.
7. Polge, C. 1956. The development of an artificial insemination service for pigs. *A.B.A.* 24:209.
8. Potter, W.L., P.C. Upton and B.L. Dunn. 1979. Morphological changes as observed by light microscopy of the acrosome of boar spermatozoa subjected to deep freezing. *Aust. J. Biol. Sci.*, 32:575.
9. Pursel, V.G. and L.A. Johnson. 1971. Procedure for the preservation of boar spermatozoa by freezing. *Agricultural Research Services, U. S. Department of Agriculture.*
10. Pursel, V.G., L.A. Johnson and G.B. Rampcek. 1972. Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. *J. Anim. Sci.*, 34:278.
11. Pursel, V.G. and L.A. Johnson. 1975. Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J. Anim. Sci.*, 40:99.
12. Pursel, V.G., L.L. Schulman and L.A. Johnson. 1978. Effect of orvus es paste on acrosome morphology, motility and fertilizing capacity of frozen-thawed boar sperm. *J. Anim. Sci.* 47:198.
13. Salamon, S. 1973. Deep freezing of boar semen. 111. Effects of centrifugation, diluent and dilution rate, pellet volume, and method of thawing on survival of spermatozoa. *Aust. J. Biol. Sci.*, 26:239.
14. Salamon, S., I. Wilmut and C. Polge. 1973. Deep freezing of boar semen. 1. Effects of diluent composition, protective agents, and method of thawing on survival of spermatozoa. *Aust. J. Biol. Sci.*, 26:219.
15. Vesser, D. and S. Salamon. 1974. Effect of composition of trisbased diluent on survival of boar spermatozoa following deep freezing. *Aust. J. Biol. Sci.*, 27:458.
16. Whittingham D.G. 1971. Culture of mouse ova. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 14:7.
17. Wilmut, I., S. Salamon and C. Polge. 1973. Deep freezing of boar semen. 111. Effects of method of dilution, glycerol concentration, and time of semen-glycerol contact on survival of spermatozoa. *Aust. J. Biol. Sci.*, 26:231.
18. Wilmut, I. and C. Polge. 1977. The low temperature preservation of boar spermatozoa. 1. The mortality and morphology of boar spermatozoa frozen and thawed in the presence of permeating protective agents. *Cryobiology* 14:471.
19. Wilmut, I. and C. Polge. 1977. The low temperature preservation of boar spermatozoa. 11. The motility and morphology of boar spermatozoa frozen and thawed in diluent which contained only sugar and egg yolk. *Cryobiology* 14:479.
20. 加藤征史郎, 井上陽一, 廣野 森, 入谷 明, 西川義正, 1976. 凍結 豚精子の運動性および頭帽の形態に及ぼす融解方法の影響, 日本凍結精液研究会會報 48:15.
21. 廣野 森, 加藤征史郎, 入谷 明, 1976. 豚凍結精液の融解過程における各種温度での時間的経過が 精子の運動性ならびに頭帽の形態におよぼす影響, 日本凍結精液研究会會報 50:8.
22. 橋爪 力, 丹羽太左衛門, 1976. 牛および豚精液の凍結保存における稀釋液の條件が精子の acrosomic systemに及ぼす影響について.

23. 大沼秀男, 1963. VI, 牛および豚の射出精子の acrosomic systemの形態ならびにその保存と温度衝撃による形態的變化, 日本農事研報 3:105.
24. 副島昭彦, 柘田博司, 和出靖松川, 善昌, 1983. 豚凍結精液におけるハレット凍結, アルミバック凍結およびストロー凍結の比較, 日本家畜人工授精研究會誌 5:6.
25. 川倉一彦, 副島昭彦, 柘田博司, 1984. ストロー法による豚精子の凍結保存, 日本家畜人工授精研誌 6:61.
26. 原島昇昱, 森山則男, 上坂 健, 劍持計夫, 1974. 豚凍結精液による1. 受胎分娩例について, 日本凍結精液研究會會報 42:14.
27. 鄭場龍, 1977. 保存液의 組成 및 凍結條件이 融解後 豚精子의 生存性, 頭帽의 形態 및 受胎에 미치는 影響, 碩士學位論文, 嶺南大學校.