

## 凍結した牛精子の受胎能力に及ぼす 長期保存（5～10年）の影響

白山勝彦\*

Effects of Long-term Storage (5 to 10 years) on  
Fertility of Frozen Bull Spermatozoa

Katsuhiko SHIRAYAMA

### 緒言

凍結精液 (Frozen semen) という言葉は、畜産の分野ではもはや通用語となり、常識となつて、なんら特別の響きを持たない。しかし、いまから20数年前までは日本にこのような言葉はなかつたし、当時、人工授精の実務において精液を0℃以下に保存することは厳禁されていた。

凍結精液なる言葉が実用的な意味をもつて初めて用いられるようになったのは1952年(昭27)、イギリスのPolge & Rowsonの報告<sup>31)</sup>以後である。このときの最長保存受胎例は20週であつたが、当時の精液保存技術の常識(4℃で数日間)をはるかに超えるものであつたところから、氏はこの成績を報告するにあつてすでに、その標題にLong-term storage (長期保存)なる言葉を用いている。

その後保存期間を逐次延長した場合の精子生存性についての報告<sup>1)3)</sup>がなされるとともに、その受胎能力についても関心が持たれて今日に至っている。

わが国においては1960年(昭36)に、京都大学農学部家畜繁殖学研究室に液体窒素による大型の精液保管器(約40,000頭分収容)が設置されてから本格的な長期保存試験が開始され、西川、入谷、吉田氏<sup>18)</sup>は、-79℃および-196℃で牛精液を2～5年間保存した場合、-79℃保存では最初の1か月間に精子生存性がかなり低下し、以後数年にわたつて僅かづつ低下するが、これに反して-196℃保存では保存期間を通じて精子生存性はほとんど低下しないことを報告し、その後同氏らによつて、精子生存性からみた長期保存の可能性について多くの綜説がなされている。<sup>10)17)19)20)21)22)</sup>

一方、長期保存による受胎性についても、1,320日

保存による受胎例<sup>11)</sup>、3年以内<sup>2)4)5)9)14)15)23)30)34)</sup>、4年保存<sup>16)32)33)</sup>、さらには6年保存<sup>7)</sup>による受胎成績が報告されてきている。

著者がかねてから凍結精液の利点の1つである長期保存についてかなりの関心をもつていたが、前記京都大学における液体窒素保管が開始されるに及んで、当時三重県畜産試験場で供用していた種雄牛の精液を凍結し、同研究室に依頼して保存するとともに、同研究室および県下宮川村の協力を得て、5～7年保存<sup>12)</sup>、8～10年保存<sup>35)</sup>の精液による受胎試験を実施し、その成績の概要を取りまとめたものから逐次報告してきた。

本報告は、これまでに三重県が行なつてきた長期保存に関する個々の成績を一括して取りまとめ、とくに精子の受胎能力が保存年数によつて影響されるものであるかどうかを検討するとともに、新たに2、3の知見を加えて報告しようとするものである。

### 材料、方法ならびに期日

#### 1) 凍結、保管

精液は、当時の三重県畜産試験場が繁殖に供用していた4頭の黒毛和種雄牛から3重壁人工腔によつて採取したものをを用いた。

精液は、30℃の条件下で凍結用セミンA液を用いて第1次稀釈し、約90分を要して緩慢に4℃に下降したのち凍結用セミンB液を用いて第2次稀釈を行なつた。第2次稀釈は所要量を5等分し10分間隔で添加、混和した。その後4℃で15～18時間のグリセリン平衡を行なつたのち、1mlのストロー精液管に分注し両端を加熱閉封し、4℃のアルコール槽内でドライアイス

加えながら下記の速度で凍結した。

+4℃～-15℃：毎分0.5℃～1.0℃

15℃～-40℃：毎分5℃～8℃

-40℃～-79℃：急速に

-79℃への凍結操作を終えた精液は、ドライアイス・アルコール中に入れて直ちに京都大学家畜繁殖学研究室へ運搬し、すべて5時間以内に-196℃の保管器内へ移し、受胎試験に供されるまでの5～10年間、同研究室で保管が継続された。

## 2) 融解、授精

受胎試験の開始に先立って、京都大学において供試精液の一部を融解して精子活力・生存率の検査を行ない、必要本数を液体窒素による小型輸送器(Linde 10 l型)に入れて受胎試験の現地へ輸送し、授精に供するまで液体窒素を補給しながら保管が継続された。

授精は、液状精液ならびに凍結精液で十分な経験を有

する2名の技術者によって行なわれ、融解はすべて庭先で井戸水または水道水(10℃～14℃)で行ない、授精対象の雌牛は「黒毛和種」に限定したほかは特定の条件を設けることなく、通常の授精業務のなかで受胎試験が行なわれた。妊否は直腸検査または分娩によって確認された。

精液の凍結は昭和37年7月14日から昭和39年2月8日までのあいだに行ない、受胎試験は昭和44年7月14日から昭和47年12月19日までのあいだに行なわれた。

## 成績ならびに考察

### 1. 長期保存後の精子生存性

供試原精液の性状、処理過程における精子生存性の推移および凍結終了直後の精子活力・生存率を一括して示すと第1表のとおりである。

第1表 供試精液の精液性状と長期保管後の精子生存性

| 凍結融解保存<br>雄牛年月日年月日年月日     | 採取直後の精液性状 |     | 最終濃度 | 精子数  | 採取直後 | 凍結過程における精子活力・生存率 |          |      |         | 保管後の精液性状 |        | 存保指数中の低精子率 | 備考   |  |
|---------------------------|-----------|-----|------|------|------|------------------|----------|------|---------|----------|--------|------------|------|--|
|                           | 量 ml      | pH  |      |      |      | 1次稀後             | グリセリン平衡後 | 凍結直後 | 精子回復率 % | 活力・生存率   | 1推定精子数 |            |      |  |
| 福金39.2.8 44.7.14 5.5      | 7.5       | 6.2 | 10.6 | 4.8  | 2.2  | 85               | 85       | 75   | 65      | 90.0     | 65     | 1.54       | 0    |  |
| 徳明39.2.8 44.7.14 5.5      | 5.5       | 6.2 | 7.6  | 10.9 | 0.7  | 85               | 85       | 80   | 35      | 44.2     | 35     | 0.28       | 3.2  |  |
| " " 37.11.29 44.10.6 6.10 | 3.5       | 6.2 | 12.8 | 9.2  | 1.4  | 80               | 80       | 80   | 40      | 50.0     | 40     | 0.63       | 0    |  |
| 福金37.10.27 44.10.30 7.0   | 6.5       | 6.2 | 13.8 | 5.6  | 2.4  | 80               | 80       | 75   | 60      | 83.4     | 65     | 1.56       | 0    |  |
| 芳照37.10.26 44.10.30 7.0   | 7.5       | 6.2 | 15.7 | 4.8  | 3.3  | 85               | 85       | 80   | 50      | 65.6     | 50     | 1.81       | 0    |  |
| 徳明38.10.23 47.7.20 8.9    | 4.8       | 6.4 | 10.2 | 9.8  | 1.0  | 80               | 80       | 75   | 30      | 38.7     | 30     | 0.30       | 0    |  |
| 流田37.7.14 47.7.20 10.0    | 4.5       | 6.2 | 11.6 | 8.5  | 1.4  | 80               | 80       | 75   | 45      | 60.0     | 45     | 0.63       | 0    |  |
| 福金37.7.14 47.7.20 10.0    | 6.2       | 6.2 | 12.6 | 10.5 | 1.2  | 85               | 85       | 80   | 45      | 56.3     | 40     | 0.48       | 11.2 |  |
| 芳照37.6.16 47.7.20 10.1    | 6.8       | 6.2 | 13.1 | 11.2 | 1.2  | 85               | 85       | 85   | 35      | 41.2     | 40     | 0.48       | 0    |  |

4頭9例中、7例の精子活力・生存率は凍結後5～10年を経てもなんら変わるところがなかった。他の2例では保存後において精子生存率で5%程度の低下が認められた。しかし常法の精子活力検査においてこの程度の判定差を認めることは稀ではなく、したがってさきの7例におけると同じく保存中の精子生存性の低下はほとんどなかったものと考えて大きな誤まりはないであろう。

牛精液を液体窒素を用いて保存した場合、保存に伴う

精子生存性の低下がほとんど認められないということは、わが国ではすでに西川氏ら(1963)<sup>24)</sup>が500日まで保存した52例の精液で確認しており、その後氏らによって保存期間をさらに5年<sup>18)</sup>、7年<sup>12)</sup>、9年<sup>27)</sup>まで延長した例についても同様の事実が確認されている。このほか同様の報告ならびに-196℃保存が-79℃保存に比べてすぐれているとする報告はまさに枚挙にいとまがない。

したがって今回著者が得た成績も、前出の諸報告を肯定する範囲にとどまるものであつたが、同時に、精子生存性を低下させることなしに保存期間をさらに延長し得ることを示唆しているものと考えられる。

2. 保存年数の経過に伴う受胎率の推移  
5～10年保存の精液による受胎率を一括して示すと第2表のとおりである。

第2表 液体窒素による牛精液の長期保存が受胎率に及ぼす影響

| 雄牛   | 保 存 期 間        |      |                     |      |                  |      |                  |      |                  |      |                  |      |                   |      |
|------|----------------|------|---------------------|------|------------------|------|------------------|------|------------------|------|------------------|------|-------------------|------|
|      | 1～6日<br>液状精液   |      | 1～6ヵ月 <sup>a)</sup> |      | 5年 <sup>b)</sup> |      | 6年 <sup>b)</sup> |      | 7年 <sup>b)</sup> |      | 8年 <sup>b)</sup> |      | 10年 <sup>b)</sup> |      |
|      | 授精             | 受胎率  | 授精                  | 受胎率  | 授精               | 受胎率  | 授精               | 受胎率  | 授精               | 受胎率  | 授精               | 受胎率  | 授精                | 受胎率  |
|      | %              |      | %                   |      | %                |      | %                |      | %                |      | %                |      | %                 |      |
| 茂 寿  | 38             | 73.7 |                     |      |                  |      |                  |      |                  |      |                  |      |                   |      |
| 美 武  | 19             | 57.9 |                     |      |                  |      |                  |      |                  |      |                  |      |                   |      |
| 谷 秀  | 37             | 43.2 | 37                  | 64.9 |                  |      |                  |      |                  |      |                  |      |                   |      |
| 秋 西  | 158            | 61.4 | 9                   | 55.6 |                  |      |                  |      |                  |      |                  |      |                   |      |
| 昭 栄  |                |      | 23                  | 52.2 |                  |      |                  |      |                  |      |                  |      |                   |      |
| 徳 明  |                |      |                     |      | 27               | 66.7 | 27               | 55.6 |                  |      | 25               | 48.0 |                   |      |
| 福 金  |                |      |                     |      | 36               | 61.1 |                  |      | 22               | 54.5 |                  |      | 15                | 53.3 |
| 芳 照  |                |      |                     |      |                  |      |                  |      | 17               | 41.2 |                  |      | 2                 | 50.0 |
| 流 田  |                |      |                     |      |                  |      |                  |      |                  |      |                  |      | 41                | 48.8 |
| 計と平均 | 252            | 60.3 | 69                  | 59.4 | 63               | 63.5 | 27               | 55.6 | 39               | 48.7 | 25               | 48.0 | 58                | 50.0 |
|      | 115/212, 54.2% |      |                     |      |                  |      |                  |      |                  |      |                  |      |                   |      |

(注) a) : 窒素ガスによる急速凍結

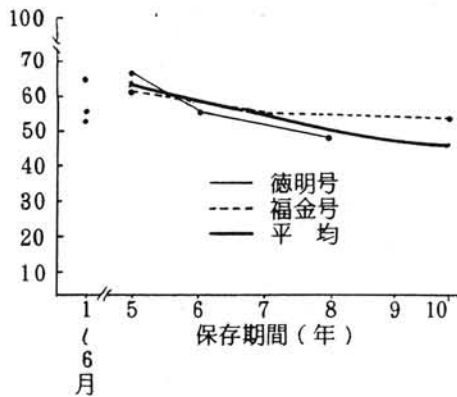
b) : ドライアイス・アルコールによる緩慢凍結

第2表の成績は、同一地域で同一技術者によつて得られたものである。ただし、供試精液は異なる種雄牛から得た精液を異なる時期に凍結して保存し、これを一定期間内に授精して得られたものであるため、通常、受胎試験の最良の方法とされている手段すなわち1回の射精液を分割して凍結保存し、これを保存期間ごとに比較したものではない。したがって厳密には保存期間の延長に伴う受胎率の推移を論ずるには若干の難点がある。

この点を考慮に入れて受胎率の推移をみると、1～6ヵ月保存した精液を授精した69頭の受胎率が59.4%であつたのに比べて、5～10年保存した精液を授精した212頭のそれは54.2%であり、統計的に有意のものではなかつた  $\{X^2_{n=i} = 0.565 < 1.074 (0.30)\}$  といえ後者に若干の低下が認められた。この場合、5年以上の保存そのものが受胎率に影響を及ぼしたと判断するのは早計であり、表に注記したごとく、凍結方法の相違がある程度受胎率に反映されていることを考慮に入れるなければならないであろう。

すなわち「窒素ガスによる急速凍結法」で凍結した精子の生存性が「緩慢凍結法」によるそれよりもすぐれていることは、前者の凍結法を開発した西川氏らによつてかなり以前に報告<sup>25)</sup>されており、その後の受胎試験においても前者による受胎率が後者のそれよりも数%すぐれているとする報告<sup>6)29)36)</sup>がなされている。今回の試験で認められた両者間の受胎率にみられる5%の差はあたかも上記の諸報告を裏付けているとも云い得る。このことから考えると、長期保存に伴う受胎率の若干の低下の原因を保存期間のみに帰するのは妥当性を欠くものであるかも知れない。

一方、種雄牛個体の差に起因する受胎率の変動をできるだけ排除する意味で、同一個体で経年変化を把握することができた2頭の種雄牛(徳明、福金)について、精液保存年数の経過に伴う受胎率の推移を図示してみると第1図のようであり、5年経過時点の受胎率が以後そのまま維持されているとは云い難い。



第1図 保存年数の経過に伴う受胎率の推移

つぎに、第1表に示した精液処理後の1ストロー中の精子数をもとにして保存後（融解時）の生存精子数を区分し、第2表の成績をもとにして保存期間を、5～6年と7～10年の2区に分け、それぞれの受胎率を比較すると第3表のとおりである。

融解時の生存精子数によって受胎率に若干の変動がみられるが、その差は統計的に有意のものとは認められなかった  $\{F_s = 1.53 < F_2^1 18.51 (0.05)\}$ 。注入精子数と受胎率の関係についてはきわめて多くの報告がなされているが、現在わが国で実用に供されている凍結精液の1ストロー中に含まれる生存精子数は最低2500万以上であることが処理の基準とされている。<sup>11)</sup>表から

第3表 授精時の生存精子数と保存期間が受胎に及ぼす影響

| 生存精子数        | 保 存 期 間 |       |          |       | 計 と 平均 |       |
|--------------|---------|-------|----------|-------|--------|-------|
|              | 5 ～ 6 年 |       | 7 ～ 10 年 |       | 授精頭数   | 受胎率   |
|              | 授精頭数    | 受胎率   | 授精頭数     | 受胎率   |        |       |
| 2,000～5,000万 | 27      | 66.7% | 42       | 50.0% | 69     | 56.5% |
| 5,000万～1億    | 27      | 55.6  | 41       | 48.8  | 68     | 51.5  |
| 1 ～ 2億       | 36      | 61.1  | 39       | 48.7  | 75     | 54.7  |
| 計と平均         | 90      | 61.1* | 122      | 49.4  | 212    | 54.2  |

(註) \* :  $F_s = 20.13 > F_2^1 18.51 (0.05)$

知れるように、少なくとも2,000万以上の精子を含むものであれば、5～10年保存後においても精子数そのものが受胎率に影響を及ぼすことはないとい得よう。

つぎに、5～6年保存の精液を授精した90頭の受胎率が61.1%であつたのに比べて、7～10年保存の精液を授精した122頭のそれは49.4%であり、受胎率の差は有意のものと認められた ( $P < 0.05$ )。

これまでに、3年以上保存した凍結精液による受胎成績の報告は前出のとおり決して少なくない。しかし同一地域で同一技術者によつて受胎試験が反復され、その受胎率の経年変化を取りまとめた報告については第2表および第3表の成績のほかは寡聞にして知るところがない。

以上を要するに、 $-196^\circ\text{C}$ で保存した場合、凍結後5年を経てもその受胎率は液状精液あるいは1～6カ月保存の凍結精液に比べてなんら遜色のないものと解されるが、以後10年までのあいだで受胎率が若干低下するのは避けられないものようである。

ただし、さきに述べたように牛精子を $-196^\circ\text{C}$ で保存した場合、精子の活力・生存率は10年後においてもなんら変わることがないのに反して、もし仮に受胎率

がある程度低下するとすれば、かかる低下が何に起因するのか、また保存何年後において明らかな低下を認めるのか、今回の試験の結果だけをもつて云々するのは早計であろう。今後さらに機会を得て受胎試験を反復し、例数の増加につとめたうえで明確な結論を得たい。

### 3. 子の在胎日数および性比

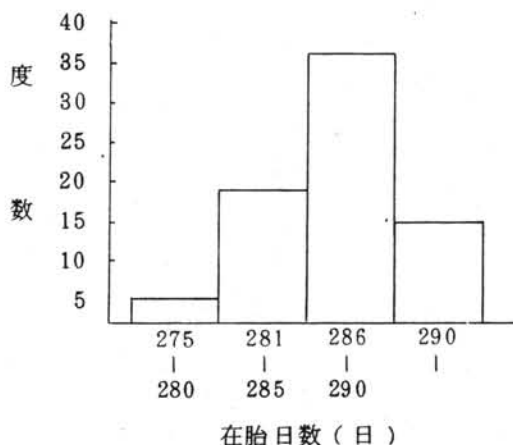
第2表において5～10年保存の精液によつて受胎を確認した115例のうち、その後の追跡調査で分娩日と子の性が明らかとなつた75例について、その在胎日数と性比を調べた結果は第4表および第2図に示される。

在胎日数の平均は287日であり、雄の子の平均は286.6日、雌の子のそれは287.4日であつて、いずれも分娩時における異常あるいは奇形などは認められなかった。

熊崎および森氏の報告<sup>13)</sup>によれば、和牛の妊娠期間は品種によつて差があり、黒毛和種のそれは平均285日であり、雄子牛は雌子牛に比べて平均2.5日在胎期間が長いという。また、平松および西川氏らは $-196^\circ\text{C}$ で6年半保存した精液を授精して分娩した9例について

第4表 5～10年保存の凍結精液で生れた子の性と在胎日数

| 保存期間 | 生れた子の性と在胎日数 |        |          |    |        |          | 計と平均 |        |
|------|-------------|--------|----------|----|--------|----------|------|--------|
|      | 雄           |        |          | 雌  |        |          |      |        |
|      | 例数          | 平均     | 範 囲      | 例数 | 平均     | 範 囲      | 例数   | 平均     |
| 5年   | 11          | 288.3日 | 284～294日 | 24 | 287.2日 | 275～294日 | 35   | 287.6日 |
| 6年   | 5           | 286.6  | 283～290  | 7  | 286.1  | 275～295  | 12   | 286.3  |
| 7年   | 0           | -      |          | 1  | 288.0  | 288      | 1    | 288.0  |
| 8年   | 1           | 281.0  | 281      | 0  | -      |          | 1    | 281.0  |
| 10年  | 12          | 285.3  | 278～293  | 14 | 288.3  | 275～295  | 26   | 286.9  |
| 計と平均 | 29          | 286.6  | 278～294  | 46 | 287.4  | 275～295  | 75   | 287.0  |



第2図 在胎日数の度数分布 (-196℃, 5～10年保存凍結精液)

在胎日数を調べた結果、その平均は277.7日であつたとしている<sup>8)</sup>。

以上のことから、今回得られた成績は上述の氏らの報告に近似した値を示しており、したがつて5～10年保存の精液を授精しても子の在胎期間に大きな変異をもたらすことはないものと考えられる。

つぎに、この試験を行なつた地区において昭和38年から同40年までのあいだに黒毛和種の液状精液を授精して分娩した276例について子の性別をしらべ、これを今回得られた成績と対比すると第5表のとおりである。

第5表 子の性別

| 区分   | 保存期間  | 雄           | 雌           | 備 考   |
|------|-------|-------------|-------------|-------|
| 凍結精液 | 5～10年 | 29<br>(39)  | 46<br>(61)  | 69～72 |
| 液状精液 | 1～6日  | 130<br>(47) | 146<br>(53) | 63～65 |

$$X^2_{n=i} = 1.670 < 2.706$$

追跡調査を終えた時点では雌の子が多いが、液状精液における性比との差は有意のものとは認められない。

西川、吉田および入谷氏は、和牛の優生計画にもとづく凍結精液の利用成績を取りまとめた結果、子の性比に偏りが認められないことを報告<sup>26)</sup>しており、一方、著者の知るかぎりでは長期保存の凍結精液を授精して生れた子の性比について多くの例数を取りまとめた報告はみることができない。

したがつて、この試験で認められた性比の偏りはひとつの事例として掲げるとども、今後例数を重ねたうえで再度検討を加えたい。

### 要 約

黒毛和種雄牛から得た精液を「基本凍結法」で凍結し、-196℃で5～10年間保存したものをを用いて受胎試験を行ない、その成績を液状精液および「窒素ガス急速凍結法」で凍結して1～6カ月保存した精液のそれと比較した。

主なる結果はつぎのとおりであつた。

- 5年間保存した精液を授精した63頭の受胎率は63.5%であり、6年、7年、8年および10年保存した精液を授精した27頭、39頭、25頭および58頭の受胎率はそれぞれ55.6、48.7、48.0および50.0%であつた。
- 7～10年保存した精液による受胎率(60/122, 49.4%)は、5～6年保存のそれ(55/90, 61.1%)よりも低くその差は有意のものと認められた( $P < 0.05$ )。
- 5～10年保存後の生存精子数を2,000万以上、5,000万以上および1億以上の3者に区分してその受胎率を比較したが、統計的に有意の差は認められなかつた。
- 5～10年保存した精液を授精して分娩を確認した75頭の産子の在胎日数の平均は287.0日であり、

雄の子の平均は286.6日、雌の子のそれは287.4日であった。

5. 75頭の産子の性別は、雄の子が29頭、雌の子が46頭であつて雌の子が多い傾向がみられたが、過去における同一地域の産子成績と比較して統計的に有意の差は認められなかつた。

この試験の実施にあたり、凍結精液の保管、受胎試験の設定および精液検査にご指導を賜わり、多大のご協力をいただいた京都大学教授西川義正博士ならびに同研究室の諸氏に厚くお礼を申し上げる。

また、受胎試験の開始にあつて格別のご理解とご協力をいただいた三重県宮川村長門野右京氏、授精実務の遂行とその後の調査に協力を惜しまれなかつた同村、森本孝之および橋本幸義の両氏に深甚の謝意を表す。

### 引用文献

- 1) Buch, N. C., Smith, V. F., and Tyler, W. J.: Bull and line differences in the survival of spermatozoa after freezing and thawing. *J. Dairy Sci.*, **39**, 1712-1716. (A. B. A.), **25**, No. 654. 1956.
- 2) Clegg, E. D., & Pickett, B. W.: Effect of storage at  $-196^{\circ}\text{C}$  on fertility. *A. I. Digest*, **14**, (3), 12. 1966.
- 3) Dunn, H. O., & Hafs, C.: A study of variation in the numbers of live sperm surviving freezing and six month's storage at  $-79^{\circ}\text{C}$ . *Anim. Breed. Abs.*, **24**, No. 1630. 1956.
- 4) Erickson, W. E., & Graham, E. F.: Effect of storage on non-return rate of frozen semen. *A. I. Digest*, **8**(7), 5. 1959.
- 5) 長谷部秀行、山下清一、入江 壮、花里通男：凍結精液研究会報、第24号、7、1968。
- 6) 原田利幸、鳥飼善史、居山猪一、西川義正：凍結精液研究会報、第18号、10、1966。
- 7) 平松栄蔵、背戸 清、三山 登、仲山 祐、山本務、西川義正：凍結精液研究会報、第29号、6、1969。
- 8) 平松栄蔵、背戸 清、三山 登、仲山 祐、山本務、西川義正：石川県畜産試験場試験研究調査成績報告書、第10号、33、1970。
- 9) 北海道立家畜人工授精所：凍結精液研究会資料、第5号、1963。
- 10) 入谷明：凍結精液研究会報、第13号、6、1964。
- 11) 家畜改良事業団精液採取処理要領(45、4、1改正)：家畜人工授精技術研修テキスト、93、日本家畜人工授精師協会、昭和49年度。
- 12) 小林健二、佐久間一夫、白山勝彦、西川義正、森本孝之：凍結精液研究会報、第33号、1、1971。
- 13) 熊崎一雄、森 純一：和牛の妊娠期間に関する統計遺伝学的研究、中国農報、4巻1号、1959(中国農試試験開始30周年記念号、37、1967から引用)
- 14) Macpherson, J. W.: Fertility of bovine semen after 3 years storage. *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, **129**, 416. 1956.
- 15) Mixner, J. P., & Wiggan, S. H.: Fertility results with frozen semen stored for two years. *J. Dairy Sci.*, **40**, 1650. 1957. (A. B. A. 26, No. 761)
- 16) Mixner, J. P., & Wiggan, S. H.: *A. I. Digest*, **8**, 19. 1960.
- 17) 永頼 弘：日本獣医学会誌、第15巻、199、1962。
- 18) 西川義正、入谷 明、吉田重雄：京大における牛凍結精子の長期保管成績、凍結精液研究会報、**20**、**21** 合併号、32。1967。
- 19) 西川義正：畜産の研究、**14**、6、1。1960。
- 20) 西川義正：凍結精液研究会報、第8号、8、1962。
- 21) 西川義正：凍結精液研究会報、第9号、1、1963。
- 22) 西川義正：凍結精液研究会報、第18号、1、1966。
- 23) 西沢藤代次、原田利幸、正田忠一、西岡虎男、藤井吉三：凍結精液研究会報、第26号、5、1968。
- 24) 西川義正：昭和38年日本畜産学会報告、1963。(凍結精液研究会資料第5号、7、1963から引用)
- 25) 西川義正、宮本 元、入谷 明：昭和41年度日本畜産学会報告、1966。
- 26) 西川義正、吉田重雄、入谷 明：凍結精液研究会報、第9号、20、1963。
- 27) 西川義正、入谷 明、加藤征史郎、吉田重雄：

- 凍結精液研究会報、第38号、1972。
- 28) 農業技術研究所：牛の凍結精液に関する試験成績。
- 29) 野呂 正、白山勝彦、西川義正：凍結精液研究会報、第20、21合併号、29、1967。
- 30) 大杉敏男、金藤襄輔、黒田範雄：凍結精液研究会報、第3号、5、1961。
- 31) Polge, C., & Rowson, L. E. A: Rep. 2nd Int. Congr. Anim. Repro. 1952, 3:90, 1952.  
(西川義正：日本における凍結精液に関する研究着手の経緯。凍結精液研究会報、第3号、1、1961。から引用)
- 32) Reading Cattle Breeding Center (Great Britain): Report on the Animal Health Services in Great Britain, 1958. London: H. M. S. O. 1960.
- 33) Rowson, L. E. A: The low temperature preservation of germinal cells. Plenary Rep. 3rd Int. Congr. Anim. Reprod. (Camb), 75-80, 1956.
- 34) 関 毅一、菊地久三郎、吉田宇八、小原勝明、戸田忠祐、似里健二、行方秀夫、中村 仁：凍結精液研究会報、第15号、16号合併号、9、1965。
- 35) 白山勝彦、西川義正、橋本幸義：凍結精液研究会報、第42号、7、1974。
- 36) 渡辺 彰、西川義正：凍結精液研究会報、第20、21合併号、22、1967。