

## 齧齒類の胚および配偶子（精子、卵子）の凍結保存

（財）日本生物科学研究所・中瀧直己

### I はじめに

哺乳動物の胚および配偶子（精子、卵子）の凍結保存は、生殖工学技術（REPRODUCTIVE BIOTECHNOLOGY）の最も重要なものの一つであり<sup>5,7)</sup>、人工授精、体外受精あるいは胚移植などの技術と併用することにより、種々の実験動物、家畜およびヒトに広く応用されている<sup>5, 8, 9, 12, 41, 42)</sup>。特に最近では、各分野でさまざまな新技術が開発されに至り、その重要性が更に増してきた。すなわち、実験動物においては外来遺伝子を導入したトランスジェニックマウス（TGマウス）が多数作出されており、その系統保存に応用されている<sup>1, 27)</sup>。また、家畜においては、牛の卵巣から採取した卵胞卵の体外成熟—体外受精—体外培養技術系の確立により、多くの受精卵が得られるようになったことから<sup>6, 14, 55)</sup>、受精卵牛への移植までの受精卵の保存法として凍結保存技術は不可欠になってきた。更に、現在、世界中で野生動物種の絶滅が深刻化しており、絶滅に瀕している野生動物（パンダ、ゴリラ、チータなど）の生殖細胞の凍結保存が盛んに試みられている<sup>13)</sup>。このような状況を鑑み、本稿では凍結保存技術が最も進んでいる齧齒類の胚および配偶子（精子、卵子）の凍結保存とその応用について、マウスを中心に述べる。

### II 配偶子および胚の凍結保存の歴史

1952年、Polge & Rowson<sup>39)</sup> がグリセリンを凍結保護物質として牛精子の凍結保存に成功して以来、精子の凍結保存はその他の家畜あるいは家畜以外の大・中型動物において試みられ<sup>8, 9, 42)</sup>、人工授精の普及も相まって急速に普及してきた。一方、小型の実験動物（ゲッ歯類）の精子の凍結保存に関する研究はほとんど成されなかったが、マウス精子の凍結保存の成功例が、最近相次いで報告されるに至った<sup>26, 38, 44, 46, 58)</sup>。

胚（受精卵）の凍結保存は、1972年、Whittingham ら<sup>53)</sup> がジメチルスルフォキシド（DMSO）を凍結保護物質として極めて緩慢に冷却する方法により、マウス胚で初めて成功し、現在までにラット、ウサギ、ハムスター、牛、馬、豚、山羊、羊、ヒヒおよびヒトなどでその成功例が報じられている<sup>5, 12)</sup>。しかしながら従来の緩慢凍結法は煩雑で凍結・融解操作に長時間を要することから、現在ではガラス化法<sup>4, 11, 40, 52)</sup>あるいは超急速凍結法<sup>16, 43, 49, 50)</sup>が開発されつつある。すなわち、高濃度の保存液に胚を移し、比較的短時間の内に直接液体窒素中に浸漬する方法である。これら方法は操作自体が極めて簡易であり、しかも短時間で凍結が完了することから、今後胚の凍結保存法として有効な方法となり得るものと思われる。

未受精卵においては、緩慢な方法での凍結保存が可能であるが、動物種はマウスのみで、その生存性は一般に胚と比べて低いのが現状である<sup>7, 51, 54)</sup>。

### III 凍結保存の意義

胚あるいは配偶子を凍結保存しておく利点はいろいろ考えられるが、主なものを以下に述べる。

#### a. 系統維持における省力化と経費の節減

現在必要でなくとも、将来その必要性が生じた場合を予想して多数の系統を継代維持していくためには、莫大な経費と労力、飼育に要する場所などが必要である。不必要な系統の胚を凍結保存しておけば、場所や経費の面で大幅な節減が可能である。また、疾患モデル動物などにおいては、その研究に従事している研究者がリタイアすれば、いかに貴重な系統であっても、その維持は非常に困難となり、自然消滅してしまうことは良くあることである。そのような場合においても胚の凍結保存はそれらの系統の維持に極めて有効であろう。

#### b. 遺伝的変化および飼育管理上の事故の防止

長期間にわたり系統を維持する際に、突然変異などによって動物本来の遺伝的形質や特性が変化した場合、また継代の途中で飼育操作のミスにより遺伝的コンタミネーションが生じた場合、あるいは飼育中に病原微生物感染事故が発生し、時にはその施設で飼育しているすべての動物を殺処分しなければならない場合がある。あらかじめもとの系統の胚を凍結保存しておけば、凍結胚よりそれらコロニーの再確立が可能である。また、他の施設から動物の分与を受ける場合にも、凍結胚の形であれば病原体などを持ち込む危険性は低く、直接生体を導入するよりは安全と考えられる。

#### c. 発生工学への応用

凍結胚の利用という面では、発生工学への応用が考えられる。すなわち、マウス前核期受精卵への遺伝子注入によるトランスジェニックマウスの作製、あるいは桑実胚および胚盤胞への胚性幹細胞のインジェクションによるキメラマウス作製への応用である。現在前核期受精卵への遺伝子注入には、新鮮な受精卵が用いられており、遺伝子注入のたびに雌に過排卵処理を行ない、雄と交配するかあるいは体外受精を行なって前核期受精卵を作出している。また、前核が最大の大きさになってから融合するまでの限られた時間内に遺伝子を前核へ注入しなければならず、一回の実験で遺伝子を注入できる受精卵の数には限度がある。したがって、あらかじめ前核期受精卵を大量に凍結保存しておけば、いつでも適当な数の受精卵を融解し、遺伝子を注入することが可能である<sup>3)</sup>。また、胚性幹細胞を用いたインジェクションキメラの作製においても、桑実胚あるいは胚盤胞を凍結保存しておけば胚性幹細胞を注入する受容胚として凍結胚の有効利用が期待される。

#### d. 絶滅に瀕している野生動物への応用

絶滅に瀕している貴重な野生動物（絶滅危惧種）の種の保存は急務を要し、かつ重要な課題である。胚の凍結保存はこのような野生動物の種の保存においても有効な方法である。しかしながら、野生動物においては、繁殖期の雌の生殖道から着床前の発生段階にあ

る初期胚を採取するのは困難であることから、胚の凍結よりもむしろ雄から精子、雌から未受精卵を別々に採取、凍結保存するケースの方がはるかに多いことが予想される。将来、凍結した配偶子間での体外受精法があらゆる種において確立されれば、これら配偶子からの産子の作出も十分可能であると思われる<sup>30, 31)</sup>。

#### e. 体外受精・人工授精への応用

マウスやラットの体外受精において受精率を左右する最大の要因は、精子の運動性である。しかしながら、コロニーによっては精子の運動性が悪く、必ずしも良好な受精率が得られず、それ以降の実験を中止せざるを得ないことはしばしば経験することである。そこで、あらかじめ良好な運動性を有するコロニーの精子を凍結保存しておけば、体外受精時にそれらの精子を用いることにより、常に安定した高い受精率を得ることが可能と考えられる。さらに、汎用性の高い系統の精子を大量に凍結保存しておけば、体外受精の際に用いる精子提供雄を常時飼育しておく必要がなくなる。一方、産仔の作出を直接の目的とする人工授精においては、排卵日の偽妊娠雌への凍結精子を用いた人工授精が十分可能である。なお、現在、ラット精子の凍結保存に関しては成功例が得られていないが、1週間程度の低温保存が可能であり、低温保存したラット精子由来の産仔が得られている<sup>47)</sup>。

#### f. ハムスターおよびラット凍結未受精卵の応用

透明帯を除去したハムスターおよびラット未受精卵へ種々の異種精子が侵入し、前核を形成することが知られており、特にヒトの妊孕性あるいは染色体検査に応用されている<sup>56)</sup>。したがって、あらかじめこのような種の未受精卵を凍結保存しておけば、ヒトのみならず、種々の異種精子の受精能などの検討が容易となり、今後、このような研究分野へのハムスターおよびラット未受精卵の利用度が更に高まるものと思われる。

### IV 凍結保存法

上述した様に、現在、マウス胚においてはガラス化法あるいは超急速凍結法が開発されまた、精子についても比較的簡易な凍結法が確立されつつある。ここでは筆者が開発したマウス胚および精子の凍結法を紹介する。

#### a 胚の超急速凍結法

細胞膜透過型のDMSO(2M)、アトアミド(1M)およびポリビニルピロリドン(PVP)(3M)を含む溶液を保存液として、あらかじめ0.5 mlのマイクロチューブに15-20  $\mu$ lの保存液を入れておき、その中に胚を移した後、10秒以内に液体窒素中に浸漬する方法である<sup>16)</sup>。融解には37°Cの温水を用いて行なうが、それと同時に0.3M シュクロースをマイクロチューブ内に加えることにより、耐凍剤の細胞毒性からすばやく胚を回避させる方法が取られている。この方法では、前核期受精卵<sup>18)</sup>、2細胞<sup>16, 20)</sup>、4細胞<sup>17)</sup> および桑実胚<sup>28)</sup> のみならず、未受精卵<sup>19, 21)</sup> においても良好な生存性が得られるのが特長である。また、この方法でラットの未受精卵および受精卵の凍結が可能であるが、マウスのそれと比べ、融解後の生存性は低いのが現状である<sup>2, 15, 24)</sup>。

## b 精子の凍結保存法

三糖類のラフィノースおよびスキムミルクをそれぞれ18% および3%の濃度で蒸留水に溶解した液を保存液とし、その保存液中で成熟雄マウスの精巢上体尾部を細切し、精子懸濁液を作製する。続いて作製した精子懸濁液をストローに充填し、液体窒素保管器内の液体窒素ガス中に約10分静置して凍結させる方法である。マウス精子においては良好な生存性が得られ<sup>26, 32)</sup>、最近、野生マウスにおいても応用されつつある<sup>36)</sup>。しかしながら、良好な受精率を得るためには、受精の場の精子濃度を通常の20~40倍に高めなければならないこと、また系統によっては、融解後の運動性が極めて低く、高い受精率が得られない点など、今後実用化へ向けての詳細な検討が必要である。

## V 凍結胚および配偶子からの個体作出システム<sup>34, 37)</sup>

胚および配偶子の凍結保存の最終目的は、融解後これら細胞から個体を作成することである。凍結マウス胚および配偶子を用いた総合的な個体作出システムを図1に示す。以下にこれら方法について述べる。

### a 凍結胚

個体を復元するという観点からは胚での凍結保存が最も有効な手段であり、融解後直ちに受容雌へ移植すれば、容易に産仔の作出が可能である。前核期受精卵から胚盤胞まですべてのステージの凍結保存が可能であり<sup>22, 52)</sup>、また、近交系においても多少系統差はあるものの、凍結胚から正常な産仔が得られている<sup>20, 59)</sup>。更に最近、野生マウスの体外受精においても比較的良好的な受精率が得られていることから<sup>35)</sup>、今後、これら野生マウスにも十分応用可能であろう。

### b 凍結未受精卵と新鮮精子の組み合わせ

凍結未受精卵を融解後、新鮮な精子を用いて体外受精を行ない、得られた胚を受容雌へ移植して産仔を作成する方法である。TGマウスにおいては、性成熟前に作製した動物が死亡するケースが少なくない。このような場合、死亡する前に過排卵処理を行ない、得られた未受精卵の凍結保存が可能である。また近い将来、卵母細胞を体外で成熟させる培養系が確立されれば、多数の卵母細胞を有する幼若マウスの卵巣から卵母細胞を採取し、体外培養で容易に成熟させることが可能となることから<sup>48)</sup>、未受精卵を凍結保存する機会が増えるものと思われる。

### c 凍結精子と新鮮未受精卵の組み合わせ

bの方法とは逆に、凍結精子を用いて新鮮未受精卵を体外で受精させ、作出した胚の移植により産仔を得る方法である。この方法もTGマウスの系統保存に極めて有用と考えられる。即ち、TGマウスにおいては導入された遺伝子が子孫に伝達されれば良いわけであるから、数の面で卵子より絶対有利である精子を凍結保存しておけば、後に容易にその凍結精子からTGマウスのコロニーを再確立することが可能である<sup>27)</sup>。また、1回の

体外受精に用いる精子数は、屠殺した一匹の雄の精巣上体に存在する精子数全体から見ればごく僅かであることから、採取した精子をいくつかに分けて凍結保存しておけば、体外受精・胚移植による産仔の作出に精子を有効に利用できるのであろう。さらに最近、低受精能凍結マウス精子でも透明帯の一部を切開した未受精卵に授精させると、受精率が飛躍的に向上する結果が得られたことから<sup>33)</sup>、今後このような技術の応用により、更に効率的な凍結精子の利用が可能となるであろう。

#### d 凍結精子を用いた人工授精

マウス精子の子宮内人工授精は、大量の精子を必要とするが<sup>45)</sup>、卵管では少量の精子で人工授精が可能であり、すでにこの方法で凍結精子由来の産仔が得られている<sup>25)</sup>。凍結精子を用いた体外受精・胚移植においては、卵子提供雌の卵子と凍結精子との間で体外受精を行ない、得られた胚をさらに受容雌へ移植するという二段階の操作を行なわなければならないが、本法は卵管膨大部－卵管采間の卵管の一部を切開し<sup>23)</sup>、その開口部から排卵した偽妊娠雌の卵管へ精子を注入するだけで、産仔の作出が可能である。しかしながら、現在のところ新鮮精子を用いた卵管内人工授精に比べ妊娠率が低く、リッターサイズが小さいのが欠点である。

#### e 凍結未受精卵と凍結精子の組み合わせ

受精率および新生仔への発生率は低値ではあるが、凍結した配偶子間で体外受精を行なって得られた胚を受容雌へ移植することにより新生仔が誕生している<sup>29)</sup>。将来、すべての系統において未受精卵および精子が良好に凍結保存できる技術が確立されれば、凍結未受精卵と凍結精子を同時に融解し、目的に合わせた胚あるいは産仔を手軽に作出することが容易に成されるであろう。また、上述した様に野生動物における胚の採取は、極めて困難なことから、このようなケースは、特に絶滅に瀕している野生動物種に応用される機会が増えるものと考えられる。

## VI おわりに

実験動物であるマウスにおいては、胚、未受精卵および精子のすべての細胞で凍結保存が可能となり、これら細胞由来の産仔が容易に作出できるようになった。特に、配偶子の凍結保存は、凍結未受精卵と新鮮精子、凍結精子と新鮮未受精卵、あるいは凍結未受精卵と凍結精子の組み合わせによる胚の作出を可能としたことから、今後マウス配偶子の応用範囲がさらに広がるものと考えられる。

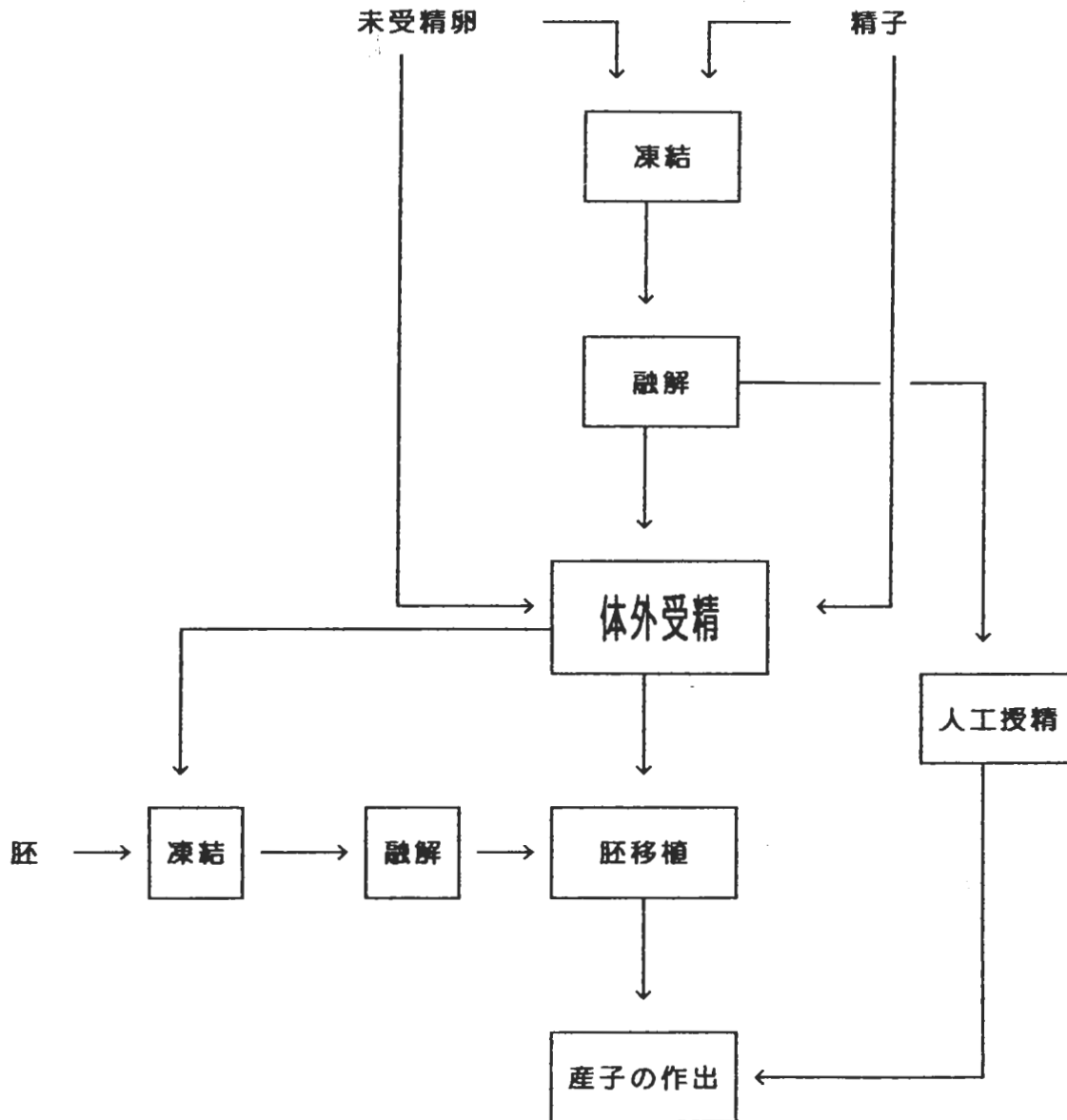
これまで述べてきたように、今やマウス胚および配偶子の凍結保存は簡易で、しかも汎用性のある技術として確立されつつある。持ち運びの容易な携帯用小型液体窒素保管器（1.5～3 l）さえあれば、どこでも簡単にこれらの細胞の凍結が可能であること、また中型の液体窒素保管器（30～40 l）ひとつあればかなりの量の細胞を保存しておくことができることから、特定の施設に限らず、将来さまざまな施設で手軽にマウス胚および配偶子の凍結保存が成され得るものと考えられる。

現在、外来遺伝子を導入したトランスジェニックマウスのみならず、特定の遺伝子を破壊したノックアウトマウスがさまざまな分野で作出されており、将来、その数はおびただ

しい数になることが予想される。したがって、胚および配偶子の凍結保存はこれら系統の保存にも大いに役立つものと思われる。

一方、野生動物においては、現在、“種の絶滅”が世界中で深刻な問題となっており、哺乳類に限っても、実に全体の約1/7に当たる約700種が絶滅の危機に瀕している。地域の生態系や生物相の崩壊が全国的規模で急速に進みつつあるわが国においても、個体数が極めて少ない野生動物種の数、亜種も含めて約50種類とされており、そのほとんどが齧歯類、翼手類および食虫目である<sup>10)</sup>。また、わが国の哺乳動物相の特長は狭い国土にもかかわらず、南北約3000kmにも及ぶ列島であることから多様な動物が生息していること、およびその多くが他の地域には見られない固有種である点である。特に、この中には奄美大島に生息するトゲネズミおよびケナガネズミなど、極めて貴重な齧歯類も含まれており、動物科学の立場からもこれら種の保全に対して積極的な対応策を早急に講じる必要がある。したがって、これまで実験動物を対象として進展してきた配偶子および胚の凍結保存技術を、このような動物種あるいは今後絶滅の危機に瀕するであろう多くの小型野生動物種に応用することも、種の保存のための新しい手段として重要と思われる。現在、私たちは世界中に生息する多くの野生ねずみ類について得られた胚および配偶子の凍結保存のデータを基に、上述したトゲネズミおよびケナガネズミ精子の凍結保存に着手しており、融解後、比較的良好な生存性を有していることを確認している。多くの野生動物を絶滅の縁に追いやったのが人間なら、それら動物種を絶滅の縁から呼び戻すのもまた、我々人間の使命であると考えられる<sup>30, 31)</sup>。

図1 凍結胚および配偶子からの個体作出システム



## 文 献

- 1) 安斉政幸, 中瀉直己, 松本和也, 高橋明男, 高橋由美, 宮田堅司 (1993). 超急速凍結保存を用いたトランスジェニックマウス由来胚の凍結保存. 実験動物, 42 : 467-470.
- 2) 安斉政幸, 中瀉直己, 松本和也, 高橋明男, 高橋由美, 宮田堅司 (1994). 超急速凍結法を用いたトランスジェニックラット由来前核期受精卵の凍結保存. 実験動物, 43 : 247-250.
- 3) 安斉政幸, 中瀉直己, 松本和也, 石川孝之, 高橋由美, 宮田堅司 (1994). 超急速法で凍結した体外受精卵由来前核期受精卵を用いたトランスジェニックマウスの作製. 実験動物, 43 : 445-448.
- 4) Friedler, S., Shen, E. and Lamb, E.J. (1987). Cryopreservation of mouse 2-cell embryos and ova by vitrification: methodologic studies. Fertil. Steril., 48: 306-314.
- 5) Friedler, S., Giudice, L. and Lamb, E.J. (1988). Cryopreservation of embryos and ova. Fertil. Steril., 49: 743-764.
- 6) Fukuda, Y., Ichikawa, M., Naito, K. and Toyoda, Y. (1990). Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized, and cultured with cumulus cells in vitro up to the blastocyst stage. Biol. Reprod. 42: 114-119.
- 7) Glenister, P.H., Wood, M.J., Kirby, C. and Whittingham, D.G. (1987). Incidence of chromosome anomalies in first-cleavage mouse embryos obtained from frozen - thawed oocytes fertilized in vitro. Gamete Res., 16: 205-216.
- 8) Graham, E.F., Schmehl, M.K.L., Evensen, B.K. and Nelson, D.S. (1978). Semen preservation in non-domestic mammals. Symp. Zool. Soc. Lond., 43: 153-173.
- 9) Graham, E.F., Schmehl, M.K.L. and Deyo, R.C.M. (1984). Cryopreservation and fertility of fish, poultry and mammalian spermatozoa, Proceedings of the 10th Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction, National Association Animal Breeders, Milwaukee. 4-31.
- 10) 環境庁自然保護局野生生物課. (1991). 日本の絶滅の恐れのある野生動物. -レッドデータブック- 脊椎動物編, 日本野生生物研究センター, 東京, pp. 27-218.
- 11) Kasai, M., Komi, J.H., Takakamo, A., Tsudera, H., Sakurai, T. and Machida, T. (1990). A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. J. Reprod. Fert., 89: 91-97.
- 12) Leibo, S.P. (1986). Cryobiology: preservation of mammalian embryos. Basic Life Sci., 37: 251-272.
- 13) Loskutoff, N.M. and Betteridge, K.J. (1992). Embryo technology in pets and endangered species. Proceeding of the 1st Congress of the Italian Society of Embryo Transfer and the International Symposium on Embryonic Technology in Domestic Species, Milan, 235-248.
- 14) Lu, K.H., Gordon, I., Gallagher, M. and McGovern, H. (1987). Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from in vitro fertilization of oocytes matured in vitro. Vet. Rec., 121: 259-260.
- 15) 棕本末男, 森 恵子, 石川尚明, 丹羽峰雄, 向坂正信. (1992). ラット過排卵処置方法および受精卵の凍結保存法について. 第39回日本実験動物学会総会講演要旨集, 92 pp.
- 16) 中瀉直己 (1989). 超急速凍結法を用いた体外受精由来マウス2細胞期胚の凍結保存について. 日本不妊学会雑誌, 34: 470-473.
- 17) 中瀉直己 (1989). 体外受精由来マウス4細胞期胚の超急速凍結保存について. 実験動物, 38: 279-282.



- 18) 中潟直己 (1989). 体外受精由来マウス前核期卵受精卵の超急速凍結保存について. 日本不妊学会雑誌、34: 757-760.
- 19) Nakagata, N. (1989). High survival rate of unfertilized mouse oocytes after vitrification. *J. Reprod. Fert.*, 87: 479-483.
- 20) 中潟直己 (1990). 各種系統マウス胚の超急速凍結保存. 実験動物、39, 299-301.
- 21) Nakagata, N. (1990). Cryopreservation of unfertilized mouse oocytes from inbred strains by ultrarapid freezing. *Exp. Anim.*, 39: 303-305.
- 22) Nakagata, N. (1990). Cryopreservation of mouse oocytes and embryos by ultrarapid freezing. Proceedings of the 14th Seminar on Science and Technology-Laboratory Animals, Interchange association, Tokyo, 251-268.
- 23) 中潟直己 (1992) マウスにおける経卵管壁卵管内胚移植の試み. 実験動物、41 : 387-388.
- 24) 中潟直己 (1992). 超急速凍結保存法を用いたラット未受精卵の凍結保存について. 実験動物、41: 443-447.
- 25) Nakagata, N. (1992). Production of normal young following insemination of frozen-thawed mouse spermatozoa into Fallopian tubes of pseudopregnant females. *Exp. Anim.*, 41, 519-522.
- 26) Nakagata, N. and Takeshima, T. (1992). High fertilizing ability of mouse spermatozoa diluted slowly after cryopreservation. *Theriogenology*, 37: 1283-1291.
- 27) 中潟直己, 松本和也, 安斉政幸, 高橋明男, 高橋由美, 松崎雄一, 宮田堅司 (1992). トランスジェニックマウス精子の凍結保存の一例. 実験動物、41: 537-540.
- 28) Nakagata, N. (1993). Survival of mouse morulae and blastocysts derived from in vitro fertilization after ultrarapid freezing. *Exp. Anim.*, 42: 229-231.
- 29) Nakagata, N. (1993). Production of normal young following transfer of mouse embryos obtained by in vitro fertilization between cryopreserved gametes. *J. Reprod. Fert.*, 99: 77-80.
- 30) 中潟直己 (1993). 胚および配偶子凍結保存技術の希少動物への応用. 哺乳類科学、33(1) : 33-40.
- 31) 中潟直己 (1993). 冷凍動物園. 科学、63 : 526-529.
- 32) Nakagata, N. and Takeshima, T. (1993). Cryopreservation of mouse spermatozoa from inbred and F<sub>1</sub> hybrid strains. *Exp. Anim.*, 42: 317-320.
- 33) 中潟直己, 上田 進, 山内一也. (1993). 透明帯切開卵子を用いた低受精能マウス凍結精子の体外受精成績. 哺乳卵学誌、10: 76-77.
- 34) 中潟直己 (1994). マウス胚および配偶子の凍結保存. 実験動物、43: 11-18.
- 35) 中潟直己, 上田 進, 山内一也, 土屋公幸, 岡本正則, 松田洋一, 東 貞宏, 豊田 裕 (1994). 野生マウス卵子の体外受精. 哺乳卵学誌、11: 80-81.
- 36) Nakagata, N., Ueda, S., Yamanouchi, K., Okamoto, M., Matsuda, Y., Tsuchiya, K., Nishimura, K., Oda, S., Koyasu, K., Azuma, S. and Toyoda, Y. (1995). Cryopreservation of spermatozoa in wild mice. *Theriogenology*, 43 : 635-643.
- 37) Nakagata, N. (1995). Studies on cryopreservation of embryos and gametes in mice. *Exp. Anim.*, 44 : 1-8.
- 38) 奥山 学, 磯貝滋樹, 佐賀正彦, 浜田 宏, 尾川昭三 (1990). マウス凍結精子の体外受精成績および人工授精試験. 日本受精着床誌、7: 116-119.

- 39) Polge, C. and Rowson, L.E.A. (1952). Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing at  $-79^{\circ}\text{C}$ . *Nature*, 169, 626-627.
- 40) Rall, W.F. and Fahy, G.M. (1985). Ice free cryopreservation of mouse embryos at  $-196^{\circ}\text{C}$ . *Nature*, 313: 573-575.
- 41) 酒井 昭 (1987). 凍結保存, pp. 97-152, 朝倉書店, 東京.
- 42) 佐藤英明, 入谷 明 (1982). 野生哺乳類への人工授精技術の応用 - 希少動物保護の観点から - . 哺乳類科学, 43-44: 31-38.
- 43) Scheffen, B., Zwalmen, P.V.D. and Massip, A. (1986). A simple and efficient procedure for preservation of mouse embryos by vitrification. *Cryo-letters*, 7: 260-269.
- 44) Tada, N., Sato, M., Yamanoi, J., Mizorogi, T., Kasai, K. and Ogawa, S. (1990). Cryopreservation of mouse spermatozoa in the presence of raffinose and glycerol. *J. Reprod. Fert.*, 89: 511-516.
- 45) 竹島 勉, 豊田 裕 (1977). マウスの人工授精、とくに受胎率および産仔に及ぼす注入精子数の影響について. *実験動物*, 26: 317-322.
- 46) 竹島 勉, 中潟直己, 尾川昭三 (1991). マウス精子の凍結保存. *実験動物*, 40: 493-497.
- 47) 竹島 勉, 中潟直己, 多田昇弘. (1993). ラット精子の低温保存. 第40回日本実験動物学会総会講演要旨集, 124 pp.
- 48) 豊田 裕 (1993). 卵成熟と受精を制御する. *遺伝*, 47: 22-28.
- 49) Trounson, A., Peura, A. and Kirby, C. (1987). Ultrarapid freezing: a new low-cost and effective method of embryo cryopreservation. *Fertil. Steril.*, 48: 843-850.
- 50) Trounson, A., Peura, A., Freemann, L. and Kirby, C. (1988). Ultrarapid freezing of early cleavage stage human embryos and eight-cell mouse embryos. *Fertil. Steril.*, 49: 822-826.
- 51) Tsunoda, Y., Parkening, T.A. and Chang, M.C. (1976). In vitro fertilization of mouse and hamster eggs after freezing and thawing. *Experientia*, 32: 223-224.
- 52) Valedoz, C.A., Mazni, O.A., Takahashi, Y., Fujikawa, S. and Kanagawa, H. (1992). Successful cryopreservation of mouse blastocysts using a new vitrification solution. *J. Reprod. Fert.*, 96: 793-802.
- 53) Whittingham, D.G., Leibo, S.P. and Mazur, P. (1972). Survival of mouse embryos frozen to  $-196^{\circ}\text{C}$  and  $-269^{\circ}\text{C}$ . *Science*, 178: 411-414.
- 54) Whittingham, D.G. (1977). Fertilization in vitro and development to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at  $-196^{\circ}\text{C}$ . *J. Reprod. Fert.*, 49: 89-94.
- 55) Xu, K.P., Greve, T., Caliesen, H, and Hyttle, P. (1987). Pregnancy resulting from cattle oocytes matured and fertilized in vitro. *J. Reprod. Fert.*, 81: 501-504.
- 56) Yanagimachi, R. (1984). Zona-free hamster eggs: their use in assessing fertilizing capacity and examining chromosomes of human spermatozoa. *Gamete Res.*, 10: 187-232.
- 57) 横山峯介, 勝木元也, 野村達次 (1988). トランスジェニックマウスの研究を支える周辺技術. *実験医学*, 6: 246-251.
- 58) 横山峯介, 秋葉久弥, 勝木元也, 野村達次 (1990). 凍結保存マウス精子の体外受精による正常産仔の作成. *実験動物*, 39: 125-128.
- 59) 横山峯介, 中潟直己 (1992). マウス胚と精子の凍結保存. *実験医学*, 10: 1591-1596.