

成熟培養液へのリノール酸アルブミン添加が ウシ卵子の耐凍性に及ぼす影響

張山 綾子¹⁾・堂地 修¹⁾・高橋 芳幸²⁾・家田 祥子¹⁾・小山 久一¹⁾

¹⁾酪農学園大学酪農学部, 江別市 069-8501

²⁾北海道大学大学院獣医学研究科, 札幌 060-0818

Effect of linoleic acid-albumin in the IVM medium on the viability of bovine oocyte after freezing

Ayako HARIYAMA¹⁾, Osamu DOCHI¹⁾, Yoshiyuki TAKAHASHI²⁾, Shoko IEDA¹⁾, Hisaichi KOYAMA¹⁾

¹⁾Department of Dairy Science, Animal Reproduction, Rakuno Gakuen University,
Ebetsu, Hokkaido 069-8501, Japan

²⁾Laboratory of Theriogenology, Department of Veterinary Clinical Sciences, Graduate School of Veterinary
Medicine, Hokkaido University, Sapporo 060-0818, Japan

キーワード : リノール酸アルブミン, 成熟卵子, 凍結・融解

Key words : linoleic acid-albumin, matured oocyte, frozen-thawed

Abstract

The objective of the present study was to investigate the effects of supplementation for in-vitro maturation (IVM) medium with linoleic acid-albumin (LAA) on the viability of post-cryopreservation matured oocytes. Cumulus oocyte complexes (COCs) were aspirated from bovine ovaries collected at a slaughterhouse and were matured in vitro in TCM199 with 1 μ g/ml E₂, 0.02 mg/ml of FSH, 0.1% PVA and 0, 0.15, or 0.3 % of LAA in an atmosphere of 5% CO₂ in air at 38.5 C for 20 h. After that, in experiment 1, the COCs were inseminated with frozen-thawed semen (5 \times 10⁶ sperm/mL). The presumptive zygotes were cultured in CR1aa + 5% CS for 9 days at 38.5 C in an atmosphere of 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ in air. There were no differences among any of the groups in the percentages of cleaved zygotes at Day 2 and blastocysts at Day 7 to 9. In experiment 2, matured oocytes after stripping free from the cumulus cells were frozen in straws with D-PBS containing 20% CS, 1.5 M ethylene glycol and 0.1 M sucrose. The frozen-thawed oocytes were inseminated similarly to experiment 1. The presumptive zygotes were cultured in CR1aa + 5% CS for 9 days at 38.5 C in an atmosphere of 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ in air. There were no differences in the percentages of cleaved zygotes and blastocysts between the LAA-supplemented and non-supplemented IVM media. These results suggest that the addition of LAA to the medium for IVM of bovine oocytes has no effect on in-vitro fertilized embryos' ability to develop to the blastocyst stage. Furthermore, supplementation of LAA into IVM medium for bovine oocytes had no effect on fertilizability of frozen-thawed matured oocytes or on their ability to develop to the blastocysts.

要 旨

ウシ体外受精における成熟培養液へのリノール酸アルブミン (LAA) 添加が卵子の耐凍性に及ぼす影響に

ついて検討した。実験には、食肉処理場由来の卵巣より採取した卵子を用いた。実験1では、LAA添加成熟培養液を用いて成熟した卵子を体外受精し、LAAが胚発育に及ぼす影響を調べた。卵子は、0、0.15あるいは0.3%のLAAを添加した成熟培養液(0.1%PVA添加へベス緩衝TCM-199)で20時間培養したのち、

18時間媒精を行った。実験2ではLAA添加成熟培養液で培養した卵丘卵子複合体をボルテックス処理し卵丘細胞を除去したのち、1.5 Mエチレングリコールおよび0.1 Mショ糖を含む凍結媒液で凍結し、融解後に体外受精を行った。実験1および2ともに媒精後の卵子は、5%牛血清(CS)添加CR1aaを用い9日間培養した。卵割率を2日目に、胚盤胞発生率を7~9日目に調べた。なお、対照区には5%CS添加TCM-199で成熟培養した卵丘卵子複合体を用いた。成熟培養液へのLAA添加の有無による差は卵割率(62.5~67.3%)にも胚盤胞発生率(32.0~36.5%)にも見られなかった。また、卵子を凍結・融解後に体外受精した結果、成熟培養液へのLAA添加の有無による凍結・融解後の正常卵率(57.9~61.3%)、卵割率(10.1~14.0%)および胚盤胞発生率(0~1.9%)に差はなかった。以上の結果より、今回の実験条件下では0.15あるいは0.3%のLAAを成熟培養液へ添加しても、凍結・融解後の卵子の発生率および耐凍性は向上しないと考えられた。

緒 言

近年、ウシ胚の超低温保存技術は飛躍的に進歩し、凍害保護物質の希釈・除去を必要としない直接移植法(MASSIP *et al.*, 1984; VOELKEL and HU, 1992A; DOCHI *et al.*, 1995)やガラス化法(MASSIP *et al.*, 1987)などの簡易な技術が報告されてきた。しかし、胚に比べて受精前の卵子および初期胚の耐凍性は低く(POLLARD and LEIBO, 1994; 富永と浜田, 2001)、卵子や初期胚に適した凍結条件や耐凍性向上について検討する必要がある。

哺乳動物の卵子の超低温保存に関する研究は、当初凍結による保存法が研究されてきた。WHITTINGHAM (1997)はマウスの凍結・融解未受精卵子を体外受精し産子の得られたことを報告した。ウシでも未成熟・成熟卵子の凍結について多くの研究(OTOI *et al.*, 1992, 1995A; SUZUKI and NISHIKATA, 1992; XU and BETTERIDGE, 1992)がなされ、体外受精後に胚盤胞や産子が得られている(Fuku *et al.*, 1992; OTOI *et al.*, 1992, 1995A, B)。しかし、これまでの研究においてウシの体外成熟卵子および未成熟卵子の凍結・融解後の生存率や発生率は低く、未成熟・成熟卵子の凍結保存技術の確立には至っていない。一方、ウシ卵子の保存法としては、最近ではガラス化法が主として用いられている(PAPIS *et al.*, 1999; VAJTA *et al.*, 1997)。ガラス化法の特徴は、卵子の細胞内外での水晶形成がなく(RALL and FAHY, 1985)、細胞内脂肪の影響を受けにくいこと、凍結保存に比べて生存率が高いと考えられている(DOBRINSKY, 1996; LEIBO and LOSKUTOFF, 1993)。しかし、ガラス化法に用いる凍害保護物質の濃度が高いため、卵子または胚に対する化学毒

性(TAHA and SCHELLANDER, 1992)と高浸透圧による物理障害(浜野と濱脇, 2001)の発生が懸念される。凍結保存では用いる凍害保護物質がガラス化に用いるそれよりも低濃度であり、卵子や胚に対する化学毒性が低く浸透圧障害も軽減されると考えられる。そのため、卵子の超低温保存法の一つとして凍結による保存法についても検討の必要性がある。

ウシ体外受精由来胚の耐凍性は発生培養液の組成によって影響を受けることが報告されている(SHAM-SUDDIN *et al.*, 1994; VOELKEL *et al.*, 1992)。TOMINAGA *et al.* (2000)および今井ら(1995)はリノール酸アルブミン(LAA)を発生培養液に添加すると、16細胞期胚や胚盤胞の凍結・融解後の生存性が向上することを報告した。本研究では、成熟培養液へのLAA添加が卵子の発生能および耐凍性を改善する効果があるかどうかを明らかにするため、LAA添加成熟培養液で培養した卵子を凍結・融解後に体外受精し、その後の卵割率および胚盤胞発生率について検討した。

材料および方法

1. 卵子の採取

食肉処理場より採取したウシ卵巣を0.1 mg/ml硫酸カナマイシン(明治製菓)を添加した滅菌生理食塩水に入れ、20~24℃に保温して実験室に持ち帰った。卵巣は同生理食塩水で数回洗浄したのち、滅菌紙で表面の水分を除去した。未成熟卵子は、18 Gの注射針を装着した5 mlシリンジに3%ウシ血清(CS)を添加した修正ダルベッコリン酸緩衝液(D-PBS)を1~2 ml入れ、直径2~5 mmの卵胞より吸引採取した。成熟培養には、卵丘細胞が透明帯の周りに緊密に3層以上付着している卵子を用いた。

2. 体外成熟培養

成熟培養液には0.02 mg/ml卵胞刺激ホルモン(FSH, アントリン, デンカ製薬)、1 μ g/mlエストラジオール(E₂, E-8875, SIGMA)および0.1%ポリビニルアルコール(PVA, P-8136, SIGMA)を添加したTCM-199(GIBCO, 12340-303)を用いた。卵丘卵子複合体はD-PBSで5回、TCM-199で2回洗浄し、さらに各々の成熟培養液で1回洗浄した。LAAを0, 0.15あるいは0.3%添加した成熟培養液を用いて、直径60 mmのシャーレ(Falcon, 1007)に100 μ lのドロップを作製し、流動パラフィン(ナカライテクス)で覆った。1ドロップ当たり20~25個の卵子を導入し、38.5℃、5%CO₂、95%空気の湿度飽和気相条件で20時間培養した。

3. 体外受精

体外受精には1頭のホルスタイン種雄牛の凍結精液

を用いた。融解した精液は TAKAHASHI *et al.* (1996) の方法に準じてパーコール密度勾配法により洗浄した。すなわち、凍結精液は 37℃ の温水に 30 秒間浸漬して融解し、15 ml 容量のプラスチック遠沈管に 90% パーコール溶液 2 ml, 45% パーコール溶液 2 ml, 精液の順で重層し、700×g で 20 分間遠心分離を行ったのち、上清を吸引・除去した。ついで、BRACKETT and OLIPHANT (1975) の方法に準じて BO 液を作製し、遠心分離後の精子塊に 10 mM ヒポタウリン (相互薬工) 添加 BO 液を 6 ml 加えて、再び 500×g で 5 分間遠心分離を行い上清を除去した。洗浄精子は、10 mM ヒポタウリン添加 BO 液で 1×10^7 /ml の濃度に調整したのちさらに等量の 0.02 g/ml ウシ血清アルブミン (BSA, Sigma, A-4378) 添加 BO 液を加えて最終濃度を 5×10^6 /ml に調整した。この精子浮遊液を用いて直径 60 mm のシャーレ (Falcon, 1007) に 100 μ l のドロップを作製し、流動パラフィン (ナカライテクス) で覆い媒精培地とした。成熟培養後の卵子および卵丘卵子複合体は 0.01 g/ml BSA を添加した BO 液で 3 回洗浄したのち、100 μ l の媒精培地に 20~25 個ずつ導入し、38.5℃, 5% CO₂, 95% 空気の湿度飽和気相条件で 18 時間培養した。

4. 発生培養

発生培養液は 5% CS 添加 CR 1 aa (ROSENKRANS *et al.*, 1993) を用いた。媒精を終了した卵子および卵丘卵子複合体は、5% CS 添加 CR 1 aa の入った 15 ml 遠沈管に移し、ボルテックス処理し卵丘卵子複合体の卵丘細胞および凍結・融解卵子上に付着した精子を完全に除去した。卵丘細胞および精子を除去した卵子は発生培養液で 3 回洗浄したのち、直径 60 mm のシャーレ (Falcon, 1007) に、流動パラフィン (ナカライテクス) で覆った 50 μ l の発生培養液のドロップを作製し、20~25 個ずつ導入して培養した。培養は、38.5℃, 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ の湿度飽和気相条件で 9 日間 (媒精日を 0 日) 行い、2 日目に卵割率、7~9 日目にそれぞれ胚盤胞の発生率を調べた。

実験 1

成熟培養液への LAA 添加が体外受精後の胚発育に及ぼす影響について調べた。成熟培養および体外受精を行った卵子および卵丘卵子複合体は、ボルテックス処理で卵丘細胞を除去したのち 9 日間培養した。なお、実験は 7 回繰り返して行った。

実験 2

成熟培養液への LAA 添加が卵子の耐凍性に及ぼす影響について調べた。成熟培養した試験区の卵子は卵丘細胞を除去したのち、家田ら (2000) の方法に準じて凍結した。すなわち、20% CS 添加 D-PBS を基本液

とし、1.5 M エチレングリコール (EG) と 0.1 M ショ糖 (Suc) を加えて凍結媒液を作製した。成熟培養を終了した卵子は 5% CS 添加 D-PBS の入った 15 ml 遠沈管に移し、ボルテックス処理で卵丘細胞を完全に除去した。その後、5% CS 添加 D-PBS で 2 回洗浄し、凍結媒液に移したのち、0.25 ml のプラスチックストロー (ストロー) に吸引し、室温下 (25℃) で 15~20 分間平衡した。ついで、ストローは、-7℃ に設定したプログラムフリーザーのメチルアルコール槽に直接移し約 5 分後に植水を行った。さらに同温度で 10 分間保持した後、-30℃ まで 0.3℃/分の速度で冷却しストローを液体窒素に投入して凍結した。融解は、液体窒素から凍結卵子上のストローを取り出し、空気中に 6 秒間保持したのち 30℃ の水に移して行った。融解後の卵子は 5% CS 添加 D-PBS で 2~3 回洗浄し、卵細胞質が均一で形態的に正常なもののみを選別して正常卵子率を調査し、体外受精に供試した。また、本研究では予備実験 (未発表データ) において卵丘を完全に除去した状態の卵子を用いた体外受精成績が卵丘卵子複合体の場合と比べて差がなかったことから、対照区に 5% CS 添加 TCM-199 で成熟培養した卵丘卵子複合体を用いた。体外受精を終了した卵子および卵丘卵子複合体はボルテックスで 60 秒間攪拌し精子を除去した後、発生培養液で作製したドロップに導入して 9 日間培養した。なお、実験は 2 回繰り返して行った。

5. 統計処理

体外受精後の卵割率および胚盤胞発生率の検定は χ^2 検定およびフィッシャーの直接確率法を用いて行った。

結 果

成熟培養液への LAA 添加がウシ体外受精卵の卵割率および胚盤胞発生率に及ぼす影響について Table 1 に示した。LAA 濃度の違いによる卵割率および胚盤胞発生率に有意な差は認められなかった。

成熟培養液への LAA 添加が凍結・融解後のウシ成熟卵子の体外受精後の発生に及ぼす影響について Table 2 に示した。凍結・融解後の正常卵子率に LAA 濃度の違いによる差は認められなかった。凍結・融解卵子の体外受精後の卵割率および胚盤胞発生率は、対照区に比べて有意に低かった ($P < 0.01$)。また、LAA 濃度の違いによる卵割率および胚盤胞発生率に差はなかった。LAA 濃度 0 および 0.15% の区では胚盤胞への発育は認められなかったが、0.3% の区で低率ではあったが胚盤胞 (4/215) が得られた。

考 察

本研究では成熟培養液への LAA 添加がウシ体外受精卵の卵割率および胚盤胞発生率に及ぼす影響は認め

Table 1 Effect of linoleic acid-alubmin (LAA) in the IVM medium on the development capacity of bovine oocytes after fertilization and culture in vitro.

Concentration of LAA (%)	No. of oocytes (No. of replicates)	No. of cleaved oocytes (%)	No. of Blastocysts* (%)
0.0	291(7)	182(62.5)	93(32.0)
0.15	275(7)	181(65.8)	96(34.9)
0.3	260(7)	175(67.3)	95(36.5)

*Blastocysts were obtained after culture of inseminated oocytes for 7 to 9 days in CR1aa medium supplemented with 5% calf serum.

Table 2 Effect of addition of linoleic acid-alubmin (LAA) to the IVM medium on the freezing ability of bovine IVM oocytes

Freezing of LAA (%)	Concentration of LAA (%)	No. of oocytes (No. of replicates)	No. of normal oocytes (%)	No. of cleavage oocytes (%)	No. of Blastocysts* (%)
-	0	127(2)	-	87(68.5) ^a	33(26.0) ^a
+	0	325(2)	188(57.9)	19(5.8) ^b	0(0.0) ^b
+	0.15	342(2)	207(60.5)	24(7.0) ^b	0(0.0) ^b
+	0.3	351(2)	215(61.3)	30(8.5) ^b	4(1.1) ^b

*Blastocysts were obtained after culture of inseminated oocytes for 7 to 9 days in CR1aa medium supplemented with 5% calf serum.

^{a,b}: Values with different superscripts in each column are significantly different, $P < 0.05$.

Oocytes frozen in 1.5M ethylene glycol and 0.1M sucrose were diluted in D-PBS supplemented with 20% calf serum.

られず、今井ら (1995) の報告を支持する結果が得られた。

LAA を添加した培養液で成熟培養したのち凍結した卵子の体外受精後の卵割率および胚盤胞発生率は新鮮卵子に比べて低く、LAA の添加効果は認められなかった。この結果から成熟培養液への LAA 添加は、成熟卵子の耐凍性向上に効果のないことが明らかとなった。

TOMINAGA *et al.* (2000) は体外受精終了後のウシ受精卵を LAA 添加培地で 4 日間培養して得られた 16 細胞期胚の凍結・融解後の胚盤胞への発育率は、LAA 無添加培地で培養した胚よりも高いことを報告している。また、HOCHI *et al.* (1999) は 0.03~0.1% の LAA を添加した修正合成卵管液を用いて作出したウシ体外受精由来桑実胚の凍結・融解後の生存性が高いことを報告している。さらに、今井ら (1995) は発生培養液に LAA を添加すると胚盤胞の耐凍性が向上することを報告した。ウシ胚の耐凍性向上における LAA 添加効果として、細胞内の不飽和脂肪酸を増加させるとともに、コレステロール比を低下させることによる細胞膜の流動性増加が挙げられる。細胞膜の流動性が増すことによって耐凍剤の侵入を促進し、その結果、耐凍性向上に貢献していると考えられる(保地, 1999)。しかし、本研究では成熟培養液への LAA 添加を試みたが、成熟卵子の耐凍性は向上しなかった。また、凍結・融解後の正常卵子率に LAA 濃度の違いによる差は認められなかった。さらに、凍結・融解後の体外受精には正常卵子のみを用いたが、LAA 添加によ

る卵割率および胚盤胞発生率の有意な改善は認められなかった。胚の初期発生段階で LAA を添加する実験として、保地 (1999) は LAA 存在下で成熟・体外受精した前核期卵子の凍結・融解後の卵割率および胚盤胞発生率は LAA 無添加の場合よりも有意に高いことを報告している。これは、LAA 添加により前核期卵子の耐凍性が向上したことを示している。本研究では、LAA 添加成熟培養液で培養した卵子を凍結・融解し体外受精しても、卵割率や胚盤胞発生率の向上は認められなかったことから、卵子と前核期卵および胚では LAA の代謝が異なるため成熟培養液に LAA を添加しても卵子の耐凍性向上効果が得られないと推察された。

CARROLL *et al.* (1990) は、凍結・融解後のマウス卵子の透明帯に穴を開けることにより体外受精における受精率が改善することを報告している。CARROLL *et al.* (1990) は凍結・融解マウス卵子の受精率低下の原因として、凍結による透明帯の硬化を挙げている。本研究でも卵子の凍結・融解により透明帯が硬化し、受精障害が生じた可能性が考えられる。しかし、本研究では受精率を調査していないため、今後、凍結・融解卵子の受精率調査を必要であると考えられた。

以上の結果より、LAA 添加成熟培養液で培養したウシ卵子を凍結・融解して体外受精に用いた場合、卵割率および胚盤胞発生率は低く、成熟培養液に LAA を添加しても卵子の耐凍性改善の効果はないと考えられた。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、ウシ卵巢の提供に多大な便宜を与えていただきました北海道畜産公社日胆事業所および北海道早来食肉衛生検査所、ならびに北海道畜産公社北見事業所および北海道東藻琴食肉衛生検査所の方々に心より感謝申し上げます。

なお、本研究は2000年度酪農学園大学・酪農学園大学短期大学部共同研究の助成(採択No.1)を受けて行ったものである。

文 献

- BRACKETT, B. G. and OLIPHANT, G. (1975) Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. Biol. Reprod., **12**: 260-274.
- CARROLL, J., DEPYPERE, H. and MATTHEWS, D. C. (1990) Freeze-thaw-induced changes of the zona pellucida explains decreased rates of fertilization in frozen-thawed mouse oocytes. J. Reprod. Fertil., **90**: 547-553.
- DOBRIŃSKY, J. R. (1996) Cellular approach cryopreservation of embryos. Theriogenology, **45**: 17-26.
- DOCHI, O., IMAI, K. and TAKAKURA, H. (1995) Birth of calves after direct transfer of thawed bovine embryos stored frozen in ethylene glycol. Anim. Reprod. Sci., **38**: 179-185.
- FUKU, E., KOJIMA, T., SHIOYA, Y., MARCUS, G. J. and DOWNEY, B. R. (1992) In vitro fertilization and development of frozen-thawed bovine oocytes. Cryobiology, **29**: 485-492.
- 浜野晴三・濱脇 淳 (2001) 牛胚の保存と利用について. 日本胚移植学会誌, **23**: 27-31.
- 保地眞一 (1999) リノール酸アルブミンによる体外受精由来ウシ胚の耐凍性増強効果. 日本胚移植学会誌, **21**: 101-105.
- HOCHI, S., KIMURA, K. and HANADA, A. (1999) Effect of linoleic acid-albumin in the culture medium on freezing sensitivity of in vitro produced bovine morulae. Theriogenology, **52**: 497-504.
- 家田祥子・堂地 修・藤澤泰之・張山綾子・小山久一 (2000) 発生培養中の酸素濃度およびリノール酸アルブミンがウシ体外受精由来胚の凍結・融解後の生存性に及ぼす影響. J. Rakuno Gakuen University, **25**: 59-64.
- 今井 敬・富沢宗高・的場理子・小林修司・後藤裕司・奥地弘明・堂地 修・下平乙夫 (1995) ウシ体外受精胚の発生および耐凍性に及ぼす各種添加物質の影響. 哺乳動物卵子学会誌, **12**: S 3.
- LEIBO, S. P. and LOSKUTOFF, N. M. (1993) Cryobiology of in vitro-derived bovine embryos. Theriogenology, **39**: 81-94.
- MASSIP, A. and VAN DER ZWALMEN, P. (1984) Direct transfer of frozen cow embryos in glycerol-sucrose. Vet. Rec. **115**: 327-328.
- MASSIP, A., VAN DER ZWALMEN, P. and ECTORS, F. (1987) Recent progress in cryopreservation of cattle embryos. Theriogenology, **27**: 69-79.
- OTOI, T., TACHIKAWA, S., KONDO, S. and SUZUKI, T. (1992) Developmental capacity of bovine oocytes cryopreserved after maturation in vitro and of frozen-thawed bovine embryos derived from frozen mature oocytes. Theriogenology, **38**: 711-719.
- OTOI, T., YAMAMOTO, K., KOYAMA, N., TACHIKAWA, S. and SUZUKI, T. (1995A) The development of immature bovine oocytes cryopreserved by 1, 2-propanediol. J. Reprod. Dev., **41**: 361-366.
- OTOI, T., YAMAMOTO, K. and SUZUKI, T. (1995B) In vitro fertilization and development of immature and mature bovine oocytes cryopreserved by ethylene glycol with sucrose. Cryobiology, **32**: 455-460.
- PAPIS, K., SHIMIZU, M. and IZAIKE, Y. (1999) The effect of gentle pre-equilibration on survival and development rates of bovine in vitro matured oocytes vitrified in droplets. Theriogenology, **51**: 173.
- POLLARD, J. W. and LEIBO, S. P. (1994) Chilling sensitivity of mammalian embryos. Theriogenology, **41**: 101-106.
- ROSENKRANS, C. F. Jr., ZENG, G. Q., MCNAMARA, G. T., SCHOFF, P. K. and FIEST, N. L. (1993) Development of bovine embryos in vitro as affected by energy substrates. Biol. Reprod., **49**: 459-462.
- RALL, W. F. and FAHY, G. M. (1985) Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. Nature, **313**: 573-575.
- SHAMSUDDIN, M., LARSSON, B., GUSTAFSSON, H. and RODRIGUES-MARTINEZ, H. (1994) A serum-free, cell-free culture system for development of bovine one-cell embryos up to blastocyst stage with improved viability. Theriogenology, **41**: 1033-1043.
- SUZUKI, T. and NISHIKATA, Y. (1992) Fertilization and cleavage of frozen thawed bovine oocytes by one step dilution method in vitro. Theriogenology, **37**: 306.
- TAHA, T. A. and SCHELLANSER, K. (1992) Developmental capacity of immature and in vitro matur-

- ed bovine oocytes after exposure to vitrification solutions. *Theriogenology*, **37**: 307.
- TAKAHASHI, Y., HISHINUMA, M., MATSUI, M., TANAKA, H. and KANAGAWA, H. (1996) Development of in vitro matured/fertilized bovine embryos in a chemically defined medium: influence of oxygen concentration in the gas atmosphere. *J. Vet. Med. Sci.*, **58**: 897-902.
- TOMINAGA, K., HAMADA, Y., YABUUE, T. and ARIYOSHI, T. (2000) Effect of linoleic acid-albumin on post-thaw survival of in vitro-produced bovine embryos at the 16-cell stage. *J. Vet. Med. Sci.*, **62**(4): 465-467.
- 富永敬一郎・浜田由佳子 (2001) ウシ体外受精由来胚の緩慢凍結およびガラス化保存. *日本胚移植学会誌*, **23**: 19-26.
- VAJTA, G., BOOTH, P. J., HOLM, P., GREVE, T. and CALLESEN, H. (1997) Successful vitrification of early stage bovine in vitro produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. *Cryo-Letters.*, **18**: 191-195.
- VOELKEL, S. A. and HU, Y. X. (1992A) Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology* **37**: 23-37.
- VOELKEL, S. A., HU, Y. X., MOOR, K. and BONDILOLO, K. R. (1992B) Freeze survival of bovine embryos produced by in vitro maturation, fertilization and culture of oocytes. *Theriogenology*, **37**: 317, abstr.
- WITTINGHAM, D. G. (1977) Fertilization in vitro and development to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at -196°C . *J. Rreprod. Fert.*, **49**: 89-94.
- XU, K. P. and BETTERIDGE, K. J. (1992) Cryopreservation of bovine oocytes using propylene glycol: preliminary results. *Theriogenology*, **37**: 324.