

水溶性プルランフィルムを用いたブタ体内発育胚の ガラス化保存後の生存性

坂上信忠, 山本 禎, 秋山 清, 仲澤慶紀¹, 小嶋信雄¹, 西田浩司, 横溝翔子²,
高木優二², 阿部宏之³, 鈴木千恵⁴, 吉岡耕治⁴

(¹ 神奈川県畜産課, ² 信州大学農学部, ³ 山形大院理工学研究科, ⁴ 動物衛生研究所)

Viability of Porcine Embryos after Vitrification Using Water-soluble Pullulan Films

Nobutada SAKAGAMI, Tadashi YAMAMOTO, Kiyoshi AKIYAMA,
Yoshinori NAKAZAWA, Nobuo KOJIMA, Kouji NISHIDA, Shoko YOKOMIZO, Yuji TAKAGI,
Hiroyuki ABE, Chie SUZUKI and Koji YOSHIOKA

水溶性プルランフィルム上でガラス化保存したブタ胚の生存性を、凍結保護物質の組成の違う二種類のガラス化保存法と比較検討した。生体から回収した胚盤胞を、0.25ml プラスチックストローを用いたストロー (ST) 区、最小容量 (MVC) 区、プルランフィルム (PFV) 区の 3 つの方法でガラス化保存し、液体窒素中で一定期間保存後、段階的に希釈して凍結保護物質を除去した。対照として非ガラス化区を設定した。ガラス化保存後の胚の生存率は、ST 区で 48.3% (43/89)、MVC 区で 70.7% (58/82)、PFV 区で 79.0% (64/81) であり、ST 区は非ガラス化区の 94.4% (51/54) と比較して有意に低下した。また、胚の品質を客観的に評価するため呼吸量を測定したところ、加温後の呼吸量は、ST 区で $0.82 (F \times 10^{14} \text{ mol/s}^{-1})$ とガラス化保存前 ($F=1.29$) と比較して有意に低下したが、MVC 区 (ガラス化保存前 $F=1.15$ 、加温後 $F=1.22$)、PFV 区 (ガラス化保存前 $F=0.99$ 、加温後 $F=1.02$) では有意な低下は認められなかった。さらに、呼吸量測定後の胚を生存細胞と死滅細胞に染め分けたところ、総細胞数に対する生存細胞の割合は、ST 区 91.9%、MVC 区 99.5%、PFV 区 97.0%であった。

キーワード：豚胚・ガラス化・プルランフィルム・呼吸量

ブタ胚の超低温保存は、優良な遺伝資源の確保と有効利用及び疾病の防除に有効な技術である。しかしブタ胚は低温に対する感受性がきわめて高い¹⁾ことから、緩慢凍結法で保存した胚の移植では人工授精と同等の受胎率、産子数を得ることが困難である。ところが、ここ数年、ガラス化保存した胚の移植によって子ブタを生産することが可能となってきた。特に超急速ガラス化保存法である最小容量 (MVC) 法^{2,3)}、open pulled straw (OPS) 法⁴⁾、microdroplet 法⁵⁾、metal mesh vitrification (MMV) 法⁶⁾では、高い胚生存性や子ブタの生産が報告されている。ガラス化保存法は、緩慢凍結法と比べて高濃度の凍結保護物質 (CPA) を使用することから、加温時に CPA を段階的に希釈する

必要があり、液体窒素から取り出したストローを直接移植器にセットして移植することは難しい。

近年、ブタにおいても非外科的移植が報告され⁷⁻¹¹⁾、我々もストローを直接取り付けることができる子宮内注入器を使用した非外科的移植に取り組んでいる¹²⁾。今後、生存性の高い超急速ガラス化保存胚を直接受胎豚に移植することが可能となれば、ブタ胚移植の生産現場での利用が進むと考えられる。

我々は、超急速ガラス化保存した胚を移植時にストロー内で加温し、直ちにレシピエントへ非外科的に移植することを目標として、ウシ胚盤胞をプルランフィルム上でガラス化保存できることを報告した¹³⁾。プルランはデンプンを原料とした天

然の中性多糖で、水に溶けるという特長があり、胚をのせたプルランフィルムを加温時に希釈液に浸漬することによりストロー内で CPA の希釈が可能となり、直接ストローを移植器に取り付けて移植できる可能性がある。

そこで、本試験では、ブタ胚の生存性についてプルランフィルムを用いたガラス化保存法と既報のガラス化保存法を比較し、併せてガラス化保存前と加温後の呼吸量の変化について検討した。

材料及び方法

1. 供胚豚及び胚回収法

供胚豚は春機発動前のランドレース種、大ヨークシャー種 39 頭を用いた (5.5~7.3 ヶ月齢)。胚回収は仲澤らの方法¹¹⁾を修正して行った。すなわち、供胚豚の耳根部に eCG (Peamex, Sankyo, Tokyo, Japan) 1,500 単位を筋肉内注射した後、72 時間後に hCG (Puberogen, Sankyo) 500 単位を筋肉内注射することによって過剰排卵処置を施した。交配

は、供胚豚に hCG を投与した翌日の午後、翌々日の午前中に行った。

供試胚は hCG 投与翌日を 0 日として 6 日目の午前中にハロセン (4~5%) 吸入麻酔下で開腹手術を施し、子宮角内を 0.5% BSA 加 PB1¹⁴⁾または TALP-Hepes¹⁵⁾で灌流して回収した。回収した胚は、倒立顕微鏡下 (倍率 100 倍) で観察し、発育ステージ等により形態的評価を行い、胚盤胞期の胚を供試した。これらの胚はガラス化保存まで BSA の代わりに FBS (Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) を 10%添加した PZM-5¹⁶⁾で保存した。

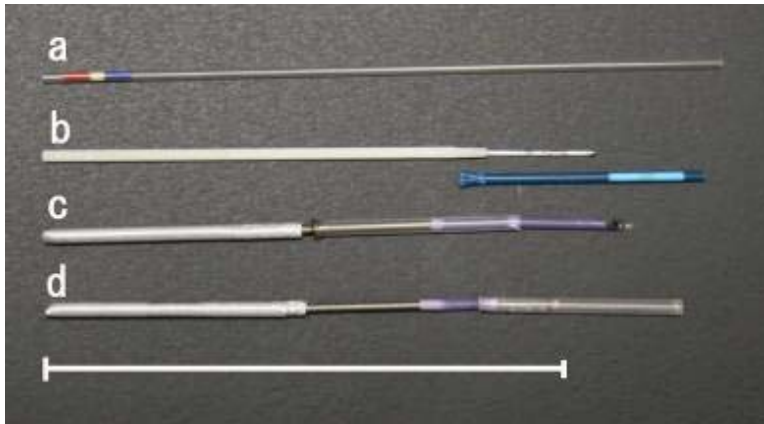
2. 胚のガラス化保存及び加温

次の 3 種のガラス化保存法により、供試胚をガラス化保存し、20~150 日間保存した後に加温し、24 時間後の生存性を調査した。表 1 に各ガラス化保存に使用した平衡液、ガラス液及び加温液を、図 1 に使用した器材を示した。

表 1. 本実験で用いたガラス化保存法及び加温法の概要

試験区	ガラス化保存法		加温法	
	平衡液及びガラス化保存液	時間 (分)	加温液	時間 (分)
ST区	PB1+0.5% BSA	2	one-step straw dilution in	2
	11% EG+PB1+0.5% BSA	5	1.7 M G A L +PB1+0.5% BSA	
	45% EG+7% PVP+PB1+0.5% BSA	1	6% EG+PB1+0.5% BSA	2
			3% EG+PB1+0.5% BSA	2
			1.4% EG+PB1+0.5% BSA	2
			0.7% EG+PB1+0.5% BSA	2
			PB1+0.5% BSA	2
MVC区	PZM5+10% FBS	2	TS液 : TCM199+1M Suc+20% SSS	1
	ES液 : TCM199+7.5% EG+ 7.5% DMSO+20% SSS	5-10	DS液 : TCM199+0.5M Suc+20% SSS	3
			WS1液 : TCM199+20% SSS	5
	VS液 : TCM199+15% EG+ 15% DMSO+20% SSS	1	WS2液 : TCM199+20% SSS	5
PFV区	D-PBS+20% FBS	2	D-PBS+20% FBS+0.6M Suc	2
	D-PBS+20% FBS+7.5% EG+ 7.5% DMSO	4	D-PBS+20% FBS+0.3M Suc	2
			D-PBS+20% FBS	2
	D-PBS+20%FBS+15%EG+15% DMSO	1		

BSA: bovine serum albumin; EG: ethylene glycol; PVP: polyvinylpyrrolidone; GAL: galactose; SSS: synthetic serum substitute; FBS: fetal bovine serum; PZM: porcine zygote medium; Suc: sucrose; DMSO: dimethyl-sulfoxide; D-PBS: Dulbecco phosphate buffered saline.



- a: ストロー
- b: クライオトップ (Cryotop®)
- c: プルランフィルムを接着したステンレス棒
- d: 鞘を閉じた状態

図1 使用した胚のガラス化保存器具

スケールバーは10cm

(1) ストロー (ST) 区

0.25ml のクリスタルストロー (IMV 社, France) を用いて、小林ら¹⁷⁾の方法を修正してガラス化保存した。室温 (20~25°C) 下で、メディウム PB1 を基礎液として 11%エチレングコール (EG) 及び 0.5% BSA を添加した平衡液のドロップ (80µl) に胚を移し、5 分間平衡した。平衡後、ガラス化保存液である 45% EG 液 [45% EG+7%ポリビニールピロリドン (PVP,分子量: 10,000, Sigma, USA) +PB1+0.5% BSA] に胚を移した。

ストロー内の液層構成は図2のとおり4層とした。胚を含むガラス化保存液の 45% EG 及び 45% EG 緩衝層を中心として、その両側に希釈液 (1.7M ガラクトース+PB1+0.5% BSA) を充填した。

胚を 45% EG に移してから 40 秒以内に、図2のとおり各液層を充填し、ストローをシールし、液体窒素に浮かべた発泡スチロール (厚さ 5mm)

上に置き、直ちにストロー綿栓部を液体窒素に一瞬浸けて希釈液を植氷した。ストローは3分間発泡スチロール上に保持し、45% EG に脱ガラス化現象 (氷晶の形成) が起こらなかったことを確認後、液体窒素中に投入した。

加温は、ストローを液体窒素から取り出し、空気 (25°C) 中に5秒間保持し、40°Cの温湯に6秒間浸した。加温後、直ちにストローを振り、ストロー内の液層を混和させ、第1段階希釈を行った。第1段階希釈後1~2分以内に、ストローから胚を6% EG (6% EG+PB1+0.5% BSA)、3% EG、1.4% EG、0.7% EG、0% EGの順に移し、合計6段階希釈を行った。なお、各段階希釈液中の静置時間は2分間とした。

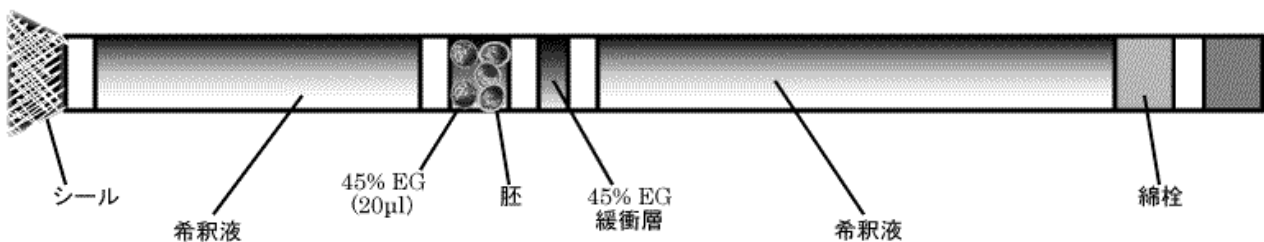


図2 ST区のスロー内の液層構成

ストロー内の液層構成は4層とし、綿栓側から、希釈液 (1.7Mガラクトース+PB1+0.5%BSA)、希釈液によるガラス化液の濃度低下を防止するための緩衝層45%EG (45%EG+7%PVP+PB1+0.5%BSA)、胚を含むガラス化液の45%EG、最後に希釈液を充填しシールで封印した。

(2) 最小容量 (MVC) 区

市販のクライオトップ及びガラス化保存液、加温液 (Cryotop®、VT101 及び VT102、北里バイオ

ファルマ) を用いて既報により行った^{2,3)}。胚を室温 (25°C) に暖めた平衡液 (ES 液) 中に投入し、胚が脱水による収縮を起こした後、体積がある程

度回復するまで5~10分静置した。胚のCPA平衡が終わった後、平衡液の持込みを最小に抑えてガラス化保存液（VS液）に胚を移した。VS液に胚を投入した後、胚が収縮したらクライオトップのシート先端部に胚をのせ直接液体窒素に投入してガラス化保存した。VS液に胚を移してからクライオトップを液体窒素に投入するまでの時間は1分以内とした。

加温は、クライオトップを液体窒素から取り出し、クライオトップシート部を38.5℃の融解液（TS液）に浸漬した。胚をTS液中に1分間保持した後、38.5℃の希釈液（DS液）に移して3分間静置した。その後洗浄液（WS1液）に移して5分間静置し、再度洗浄液（WS2液）に移して5分間静置した。

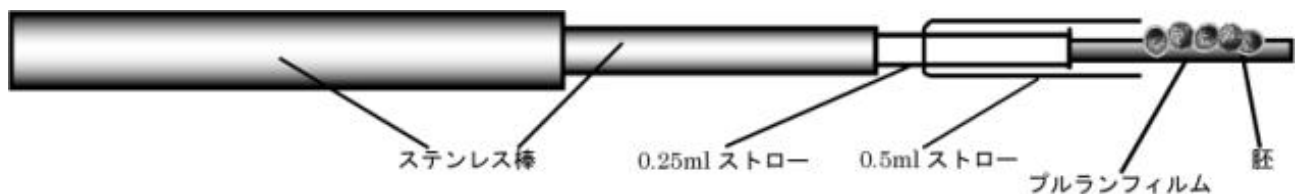


図3 プランフィルムを接着したガラス化保存器具

ステンレスの棒の先に短く切断した0.25mlのストローを取り付け、その先にプランフィルムを接着した。0.25mlストローとプランフィルムの外側に、0.5mlのストローを加工したさやを取り付け、胚を含むガラス化液をプランフィルムにのせ、液体窒素中でガラス化保存後にスライドさせて、プランフィルムを保護した。

3. 胚の生存性

加温操作後の胚を0.1mM βメルカプトエタノール及び20% FBS添加TCM199液で24時間、5% CO₂ in Airで培養し、顕微鏡下で胞胚腔の形成状況を観察し、胞胚腔が再形成された胚を生存と判定した。非ガラス化区としてガラス化保存しない胚を同様に24時間培養した。

4. 呼吸量の測定

一部の胚で、ガラス化保存30分前と加温30分後の呼吸量を測定した。胚の呼吸量は走査型電気化学顕微鏡を改良した受精卵呼吸測定装置（HV-403: (株)機能性ペプチド研究所）により阿部ら¹⁹⁾の方法に準じて測定した。測定液（ERAM-2）で満たした測定プレート（RAP-1）内の円錐形ウェルの底部に胚を静置した後、白金微小電極を胚近傍に移動した。微小電極を、酸素が還元可能な-0.6 V vs Ag/AgClに電位を保持した後、移動速度31.1μm/sec、走査距離160 μmの条件に設定し、コンピューター制御により透明帯直近

(3) プランフィルム（PFV）区

幅1mm、長さ5mm、厚さ20μmのプランフィルム（林原商事）を図3のような保存器具に接着し、高木らが報告した方法¹⁸⁾を修正してガラス化保存した¹³⁾。すなわち胚を20% FBS添加D-PBSで2分静置した後、7.5% EG+7.5% DMSO+0.3M Sucroseを添加した20% FBS添加D-PBSで4分間平衡し、その後、ガラス化保存液（EDS30:15% EG、15% DMSO、0.6M Sucrose、20% FBS添加D-PBS）に移し、1分以内にプランフィルム上にのせ、液体窒素に浸漬した。

加温は、0.6M Sucroseを添加した20% FBS添加D-PBS液に直接フィルムを2分間浸漬することにより行った。その後0.3M Sucroseを添加した20% FBS加D-PBS液に2分、20% FBS加D-PBS液に2分静置した。

をZ軸（上下）方向に自動的に走査した。異なる箇所でも2回マイクロ電極を走査後、胚の呼吸量は球面拡散理論式²⁰⁾に基づき、開発した専用の解析ソフトを用いて算出した。

5. 生存細胞、死滅細胞の染め分け

ガラス化保存胚の細胞の染め分けは、Saha and Suzukiの方法²¹⁾により行った。すなわち呼吸量を測定した胚を、38.5℃に加温した20% FBS加TCM199で洗浄後、以下の染色液で30分培養することで生存細胞と死滅細胞を二重染色した。染色液は10 μg/ml bisbenzimidazole (Hoechst 33342, Calbiochem, San Diego, CA, USA)、10 μg/ml propidium iodide (PI; Sigma)を添加したTCM199を用いた。染色した胚は、20% FBS加TCM199で一度洗浄し、少量の20% FBS加TCM199とともにスライドガラスに乗せ、カバーガラスでカバーした。染色した胚の観察は蛍光装置を接続した倒立顕微鏡により実施した。U励起波長のフィルター（365 nmの励起波長、400 nmのバリアフィル

ター)で観察し、青色(bisbenzimidazole)に染まった核は生存細胞、ピンク色(PI)に染まった核は死滅細胞としてカウントした。

6. 統計処理

実験は各区で3~4回反復して行い、データの統計処理は、コンピューター統計処理ソフトSPSS (SPSS 11.5J User's Guide, SPSS Inc. Tokyo)を用いた。生存率の比較は χ^2 検定またはFisherの直接確立法を使用した。細胞数はあらかじめ対数変換を行い、その他は一般線型モデル(GLM)を用い

て検定後にScheffeの方法により多重比較を行った。有意差水準は5%とした。

結 果

1. 各ガラス化保存後の胚の生存率

加温後のガラス化保存胚の生存率を表2に示した。ST区の生存率は、他のガラス化保存区や非ガラス化区と比較して有意に低かった。しかし、MVC区とPFV区の間には有意な差は認められなかった。また、非ガラス化区は他のガラス化保存区と比較して有意に高い生存率であった。

表 2. 各ガラス化保存法で保存されたブタ胚の加温後の生存率

試 験 区	胚 数	
	供試胚数	生存胚数 (%)
ST区	89	43 (48.3) ^a
MVC区	82	58 (70.7) ^b
PFV区	81	64 (79.0) ^b
非ガラス化区	51	54 (94.4) ^c

^{a-c} 異符号間に有意差有り (P<0.05)

2. 各ガラス化保存法における胚の呼吸量の変化

PFV区の加温後の呼吸量は、MVC区及びST区と差が認められなかったが、ST区は、MVC区と比較して有意に低かった(表3)。また、ST区では保存前と比較して有意に呼吸量は低下し

たが、MVC区、PFV区では保存前と加温後の呼吸量に差は認められなかった。各区における保存前の呼吸量に対する加温後の呼吸量の割合に、差は認められなかった。

表 3. 各ガラス化保存法で保存されたブタ胚のガラス化保存前、加温後の呼吸量

試 験 区	供試胚数	呼吸量 ($F \times 10^{14} / \text{mol s}^{-1}$)		b/a (%)
		ガラス化保存前	加温後*	
		(a)	(b)	
ST区	10	1.29 ± 0.17 ^A	0.82 ± 0.09 ^{a,B}	77.2 ± 19.9
MVC区	15	1.15 ± 0.08	1.22 ± 0.08 ^b	117.8 ± 12.8
PFV区	11	0.99 ± 0.08	1.02 ± 0.09 ^{ab}	108.2 ± 9.6
非ガラス化区	10	1.32 ± 0.14	-	-

Mean ± SEM.

*加温30分後に計測

^{a, b} 同列の異符号間に有意差有り (P<0.05)

^{A, B} 同行の異符号間に有意差有り (P<0.05)

3. 各ガラス化保存後の細胞数

それぞれのガラス化保存法で保存した胚の加温後の細胞数を表4に示した。ST区において生存細胞数及び総細胞数に対する生存細胞数の割合

合が、MVC区と比較して有意に低かった。また、加温後の胚の呼吸量と生存細胞数との間に、正の相関が認められた ($P < 0.01$, $r = 0.496$ 図4)。

表4 各ガラス化保存後の胚の細胞の生存性

試験区	供試胚数	供試胚の平均細胞数		総細胞数に対する生存細胞数の割合 (%)
		総細胞数	生存細胞数	
ST区	10	700 ± 25	644 ± 32 ^a	91.9 ± 2.7 ^a
MVC区	13	862 ± 43	859 ± 44 ^b	99.5 ± 0.3 ^b
PFV区	9	823 ± 35	802 ± 43 ^{ab}	97.0 ± 1.8 ^{ab}
非ガラス化区	10	703 ± 3.7	703 ± 3.7 ^{ab}	100 ± 0 ^b

Mean ± SEM.

^{a,b} 同列の異符号間に有意差有り ($P < 0.05$)

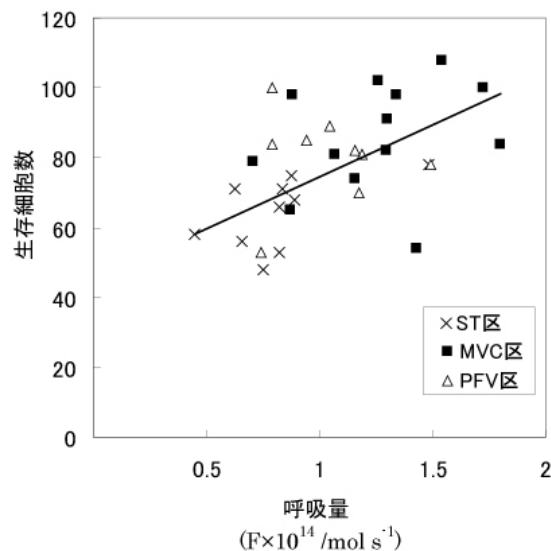


図4 ガラス化保存し加温した胚の呼吸量と生存細胞との相関

加温後の胚の呼吸量と生存細胞数との間に正の相関が認められた ($P < 0.01$, $r = 0.496$)。

× : ST区、■ : MVC区、△ : PFV区

考 察

本試験において、ブタ胚がプルランフィルムを用いてガラス化保存できることや、PFV区における加温後の胚の生存率や呼吸量及び生存細胞数が、クライオトップを用いたガラス化保存法と差がないことが明らかとなった。

ガラス化保存では、細胞内に氷晶を形成させないように高濃度のCPAを使用するため、ガラス化保存作業に時間を要するとCPAの毒性のために胚の生存性が低下することが知られている^{3,22)}。そのため、胚に対してダメージを与えると考えられる温度帯を超急速に通過させる超急速ガラス化

保存法では、高い生存性が得られることが知られている²⁻⁶⁾。これらの方法では特殊な器材を用いることによりガラス化保存液をきわめて少量にでき、急速に冷却することで CPA 濃度を下げることができるため、加温後の胚の生存性が高まる²³⁾。本試験では、超急速ガラス化保存法の 1 つである MVC 法とプルランフィルムを用いた PFV 法を比較し、PFV 法で MVC 法と同等の 70%以上の生存率が確保できることを明らかにした。一方で、ST 区においては他の区と比較して生存率が有意に低下した。これらの結果は、ガラス化保存液の量が ST 区の 20 μ l と比較して MVC 区や PFV 区では 0.1 μ l と少量であること、液体窒素への投入方法が ST 区の液体窒素蒸気にさらしてから液体窒素へ投入する方法と比較して MVC 区、PFV 区では液体窒素へ直接投入する方法であることから、ガラス化保存時の温度降下が急速になったためと考えられた。

ガラス化保存は、プログラムフリーザーを用いない手法である反面、特殊な器材を使用し高濃度の CPA を使用するため、液体窒素に投入するまでに厳密な温度、時間の管理が必要となる。このため、1 回に保存できる胚の数は限られているが、牛島ら³⁾は MVC 法において、8~12 個の胚を同時に保存できることを報告している。しかし、ブタでは、1 回の移植で 15~20 個の胚を移植に要するため、より多くの胚を同時に保存できる方法が望ましいと考えられる。今回我々はプルランフィルムを使用して 5~8 個の胚を同時に保存することが可能であったことから、5~8 個の胚をプルランフィルム上でガラス化保存し、3~4 枚のプルランフィルムを同一ストロー内に希釈液とともに封入することで、適当数の超急速ガラス化保存胚を受胎豚に非外科的に直接移植できる可能性がある。また、我々は PFV 法を用いてウシ胚をガラス化保存し、正常な産子をすでに得ていることから、PFV 法は胚発生に悪影響は及ぼさないものと考えられる。もし、プルランフィルムを用いてストロー内でガラス化保存したブタ胚を、生産者の庭先で簡便に加温し、非外科的に移植することが可能となるならば、PFV 法はブタ胚移植に有効な手段と考えられる。今後は、ストロー内の一段階希釈法についても検討する必要がある。

しかし、本試験の PFV 区は開放系の保存方法であり、液体窒素が直接胚と接触するために、防疫上の問題がある。Bielanski ら²⁴⁾は、液体窒素にふれる形で長期保存された胚は、病原菌等に汚染される可能性があることを報告しており、本試験では、

供胚豚間のコンタミネーションを予防するために、供胚豚毎に液体窒素容器を分けて胚を保存した。今後はプルランフィルムをストローに封入する方法をとることによって解決が可能であると考えられる。

さらに本試験では、胚の品質を無侵襲で客観的に評価できる呼吸量^{19,25,26)}を測定して、3 種のガラス化保存法を比較した。ガラス化保存前と加温後の胚の呼吸量は ST 区で有意に低下したが、ガラス化保存前の呼吸量に対する加温後の呼吸量の割合は、ST 区(77.2%)と比較して MVC 区(117.8%)、PFV 区(108.2%)では高い値を示し、生存性を反映した結果となった。

Dobrnisky ら²⁷⁾はガラス化保存の成否は、CPA が細胞器官や膜に与える影響に依存すると報告している。本試験では、ヘキストと PI を使用することで生存細胞と死滅細胞を染め分けたところ、ST 区におけるガラス化保存胚の生存細胞数は他の区より低い結果であり、総細胞数に対する生存細胞の割合においても 5~7%程度、他の区と比較して低い値であった。これは ST 区に加温後の胚の生存率(48.3%)が、他の MVC 区(70.7%)、PFV 区(79.0%)、非ガラス化区(94.4%)と比べ著しく低いことに反映しているのではないかと考えられた。さらに加温後の呼吸量及び総細胞数に対する生存細胞の割合が、ST 区において MVC 区と比較して有意に低いことも明らかとなった。また、ガラス化保存胚の加温後の呼吸量と生存細胞数との間に正の相関が認められた。Trimarchi ら²⁸⁾は、マウス胚ではミトコンドリアの成熟が代謝の増加と関連し、呼吸量は細胞数やミトコンドリア活性を反映していると報告している。このことから、ガラス化保存胚の生存細胞数を呼吸量測定によって推測できると考えられた。

今回の結果では、PFV 区に加温後の胚の生存率や呼吸量、生存細胞数は既報の MVC 区と有意な差が認められなかったことから、プルランフィルムを用いたブタ胚のガラス化保存が可能であると考えられた。近年、我々はストローを直接取り付けて子宮内に送り込む器材を用いて、ブタ胚の非外科的移植に取り組んでいる。今後、超急速ガラス化保存後のブタ胚を、顕微鏡下で操作することなく加温後直ちに受胎豚に直接移植することが可能となれば、生産現場での利用に有効であると考えられるため、ストロー内での希釈方法の検討が望まれる。

引用文献

- 1) Pollard JW, Leibo SP. Chilling sensitivity of mammalian embryos. *Theriogenology* 1994; 41:101-106.
- 2) Esaki R, Ueda H, Kurome M, Hirakawa K, Tomii R, Yoshioka H, Ushijima H, Kuwayama M, Nagashima H. Cryopreservation of porcine embryos derived from in vitro-matured oocytes. *Biol Reprod* 2004; 71:432-437.
- 3) Ushijima H, Yoshioka H, Esaki R, Takahashi K, Kuwayama M, Nakane T, Nagashima H. Improved survival of vitrified *in vivo*-derived porcine embryos. *J Reprod Dev* 2004; 50: 481-486.
- 4) Cuello C, Gil MA, Parrilla I, Tornel J, Vázquez JM, Roca J, Berthelot F, Martinat-Botté F, Martínez EA. In vitro development following one-step dilution of OPS-vitrified porcine blastocysts. *Theriogenology* 2004; 62:1144-1152.
- 5) Misumi K, Suzuki M, Sato S, Saito N. Successful production of piglets derived from vitrified morulae and early blastocysts using a microdroplet method. *Theriogenology* 2003; 60:253-260.
- 6) Fujino Y, Kojima T, Nakamura Y, Kobayashi H, Kikuchi K, Funahashi H. Metal mesh vitrification(MMV)method for cryopreservation of porcine embryos. *Theriogenology* 2008; 70:809-817.
- 7) Yonemura I, Fujino Y, Irie S, Miura Y. Transcervical transfer of porcine embryos under practical conditions. *J Reprod Dev* 1996; 42:89-94.
- 8) Suzuki C, Iwamura S, Yoshioka K. Birth of piglets through the non-surgical transfer of blastocysts produced *in vitro*. *J Reprod Dev* 2004; 50:487-491.
- 9) Martinez EA, Caamaño JN, Gil MA, Rieke A, McCauley TC, Cantley TC, Vazquez JM, Roca J, Vazquez JL, Didion BA, Murphy CN, Prather RS, Day BN. Successful nonsurgical deep uterine embryo transfer in pigs. *Theriogenology* 2004; 61:137-146.
- 10) Cuello C, Berthelot F, Martinat-Botté F, Venturi E, Guillouet P, Vázquez JM, Roca J, Martínez EA. Piglets born after non-surgical deep intrauterine transfer of vitrified blastocysts in gilts. *Anim Reprod Sci* 2005; 85:275-286.
- 11) Nakazawa Y, Misawa H, Fujino Y, Tajima S, Misumi K, Ueda J, Nakamura Y, Shibata T, Hirayama Y, Kikuchi K. Effect of volume of non-surgical embryo transfer medium on ability of porcine embryos to survive to term. *J. Reprod Dev* 2008; 54:30-34.
- 12) 吉岡耕治. ブタの非外科的胚移植カテーテルの開発. *畜産技術* 2007; 627:6-10.
- 13) 坂上信忠、秋山清、横溝翔子、高木優二. 水溶性プルランフィルムを用いた牛体外生産胚のガラス化保存. *J Reprod Dev* 2007; 51:j57 (abstract).
- 14) Quinn P, Barros C, Whittingham DG. Preservation of hamster oocytes to assay the fertilizing capacity of human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1982; 66:161-168.
- 15) Bavister BD, Leibfried ML, Lieberman G. Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. *Biol Reprod* 1983; 28:235-247.
- 16) Yoshioka K, Suzuki C, Tanaka A, Anas IMK, Iwamura S. Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium. *Biol Reprod* 2002; 66: 112-119.
- 17) Kobayashi S, Takei M, Kano M, Tomita M, Leibo SP. Piglets produced by transfer of vitrified porcine embryos after stepwise dilution of cryoprotectants. *Cryobiology* 1998; 36: 20-31.
- 18) Takagi Y, Shimizu M, Kato T, Danguri A, Sakamoto M. Vitrification of mouse morulae by a new method: pullulan film-straw

- vitrification. *Reprod Fertil Dev* 2004; 16: 183 (abstract).
- 19) Abe H, Shiku H, Aoyagi S, Hoshi H. In vitro culture and evaluation of embryos for production of high quality bovine embryos. *J Mamm Ova Res* 2004; 21:22-30.
- 20) Shiku H, Shiraishi T, Ohya H, Matsue T, Abe H, Hoshi H, Kobayashi M. Oxygen consumption of single bovine embryos probed with scanning electrochemical microscopy. *Analytical Chemistry* 2001; 73: 3751-3758.
- 21) Saha S, Suzuki T. Vitrification of in vitro produced bovine embryos at different ages using one- and three-step addition of cryoprotective additives. *Reprod Fertil Dev* 1997; 9:741-746.
- 22) 葛西孫三郎. 哺乳動物における卵子及び胚のガラス化保存. *日本胚移植学雑誌* 2001; 23 : 12-17.
- 23) Martino A, Songsasen N, Leibo SP. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol Reprod* 1996; 54:1059-1069.
- 24) Bielanski A, Bergeron H, Lau PCK, Devenish J. Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. *Cryobiology* 2003; 46: 146-152.
- 25) Sakagami N, Akiyama K, Nakazawa Y. The relationship between oxygen consumption rate and pregnancy rate of bovine embryos. 2007; *Reprod Fertil Dev* 19:225(abstract) .
- 26) Lopes AS, Madsen SE, Ramsing NB, Løvendahl P, Greve T, Callesen H. Investigation of respiration of individual bovine embryos produced *in vivo* and *in vitro* and correlation with viability following transfer. *Hum Reprod* 2007; 22: 558-566.
- 27) Dobrinsky JR. Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Theriogenology* 1996; 45: 17-26.
- 28) Trimarchi JR, Liu L, Porterfield DM, Smith PJS, Keefe DL. Oxidative phosphorylation-dependent and -independent oxygen consumption by individual preimplantation mouse embryos. *Biol Reprod* 2000; 62: 1866-1874.