

## 新規開発したガラス化胚保存器具「ビトラン-7」使用による ウシ胚の生存性と受胎率および生産現場における移植成績

工藤 敬幸<sup>1)</sup> 保本 朋宏<sup>1)</sup> 日高 健雅<sup>1)</sup> 山本 哲史<sup>1)</sup>  
福本 豊<sup>1)</sup> 荒木 秀美<sup>1)</sup> 御澤 弘靖<sup>2)</sup> 横田 文彦<sup>1)</sup>

(受付：令和4年2月4日)

### Viability and conception ratio of bovine embryo preserved by “Vitran-7”: a newly developed embryo vitrification device.

TAKAYUKI KUDOU<sup>1)</sup>, TOMOHIRO YASUMOTO<sup>1)</sup>, TAKEMASA HIDAKA<sup>1)</sup>, SATOSHI YAMAMOTO<sup>1)</sup>,  
YUTAKA FUKUMOTO<sup>1)</sup>, HIDEEMI ARAKI<sup>1)</sup>, HIROYASU MISAWA<sup>2)</sup> and FUMHIKO YOKOTA<sup>1)</sup>

- 1) Hiroshima Prefecture Livestock Technology Reseach Center 5584  
Nanatsuka-cho, Shobara-shi, Hiroshima-ken 727-0023
- 2) Misawa Medical Industry Co., Ltd. 1320-5 Nagatoro, Kasama-shi,  
Ibaraki-ken 309-1712

#### SUMMARY

Our center developed “Vitran-7”, an instrument for thawing and transplanting embryos preserved by vitrification at any preferred time and site, jointly with Misawa Medical Industry Co., Ltd. To evaluate the practicality of Vitran-7, embryo thawing and transplantation tests were performed, and the results of transplantation using marketed Vitran-7 preserved embryos by private transplantation technicians were investigated. In the thawing test, the embryo survival rate was 96.3% using embryos preserved in Vitran-7 and 96.8% using embryos preserved in Cryotop with no significant difference. In the transplantation test, the conception rate in nulliparous cows was 45.2% using embryos preserved in Vitran-7, 29.2% using embryos cryopreserved by slow freezing, and 72.2% using embryos preserved in Cryotop, with a significant difference between embryos cryopreserved by slow freezing and those preserved in Cryotop. In parous cows, the conception rate was 53.8% using embryos preserved in Vitran-7, 40.0% using embryos cryopreserved by slow freezing, and 33.3% using embryos preserved in Cryotop. The conception rate using marketed embryos was 52.3% after preservation in Vitran-7,

1) 広島県立総合技術研究所畜産技術センター (〒727-0023 庄原市七塚町 5584)

2) ミサワ医科工業株式会社 (〒309-1712 茨城県笠間市長兎路 1320-5)

14.1% after cryopreservation by slow freezing, 49.5% after preservation in Cryotop, and 50.3% using fresh embryos, with significant differences using embryos preserved in Vitran-7, those preserved in Cryotop, and fresh embryos compared with embryos cryopreserved by slow freezing. There was no problem in the practicality of embryos preserved in Vitran-7 with regard to the conception ability, and the conception rate was confirmed to be comparable to that using vitrified embryos or fresh embryos in embryonal transplantations performed primarily by private transplantation technicians. By the use of Vitran-7, it has become possible to thaw and transplant embryos preserved by vitrification with a high conception rate at any preferred time or site.

— Key words: Vitrification, thawing, devitrification, direct transplantation

## 要 約

本センターはミサワ医科工業株式会社と共同で、ガラス化保存胚を任意の日時・場所で融解し移植できる器具である「ビトラン-7」を開発した。ビトラン-7の実用性を検証するため、胚の融解試験及び移植試験を実施するとともに、販売したビトラン-7保存胚を用いた民間移植技術者による移植成績を調査した。融解試験の結果、生存胚率はビトラン-7保存胚が96.3%、Cryotop保存胚が96.8%であり、ビトラン-7保存胚とCryotop保存胚との間に有意差は認められなかった。移植試験では未経産牛の受胎率は、ビトラン-7保存胚が45.2%、緩慢凍結保存胚が29.2%、Cryotop保存胚が72.2%であり、緩慢凍結保存胚とCryotop保存胚との間に有意差が認められ、経産牛の受胎率は、ビトラン-7保存胚が53.8%、緩慢凍結保存胚が40.0%、Cryotop保存胚が33.3%であった。販売胚の受胎率は、ビトラン-7保存胚が52.3%、緩慢凍結保存胚が14.1%、Cryotop保存胚が49.5%、新鮮胚が50.3%であり、ビトラン-7保存胚、Cryotop保存胚及び新鮮胚と緩慢凍結保存胚との間に有意差が認められた。ビトラン-7保存胚の受胎性は実用性に問題無く、民間移植技術者が主体となった胚移植において受胎率がガラス化胚及び新鮮胚と同程度であると確認できた。ビトラン-7を活用することにより、任意の日時・場所で受胎率の高いガラス化保存胚を融解・移植することが可能となった。

— キーワード：ガラス化、融解、脱ガラス化、ダイレクト移植

## 序 文

広島県では、2025広島県農林水産業アクションプログラムに基づき、持続可能な広島和牛生産体制の構築を目的とし、和牛体外胚移植による乳牛を借り腹とした和牛生産を推進している。

胚移植を普及させるためには、任意の日時・場所で移植可能な方法を定着させることが有効な方法の一つと考えられる。現在、任意の日時・場所で融解・移植が可能な緩慢凍結法により保存した胚のダイレクト移植が広く普及しており<sup>1)</sup>、広島県における平成30年

度胚移植状況調査では、全体の32.5%で緩慢凍結保存胚が用いられていた。一方で、同調査によると、受胎率はガラス化法により保存した胚が42.1%であるのに対して緩慢凍結保存胚は21.9%であり、緩慢凍結保存胚の受胎率が低い課題がある。ガラス化保存胚は高い受胎率が期待できるが、試験室内での融解が必要なため作業が煩雑であり、普及面に課題がある<sup>1),2)</sup>。また、新鮮胚は凍結による細胞傷害が無く高い受胎率が期待できるが、胚の供給日が限定されるため普及面に課題がある。

本センターはミサワ医科工業株式会社と共同で、高

い受胎率が期待できるガラス化保存胚を任意の日時・場所で融解・移植できる器具である「ビトラン-7」を開発した(特許第6238186号)。今回、ビトラン-7の実用性を確認するため、胚の融解試験及び移植試験を実施するとともに、令和元年10月から販売を開始しているビトラン-7保存胚の受胎成績を調査したので、その概要を報告する。

## 材料と方法

### 1 卵子の採取

牛卵子の採取は、と体卵巢からの吸引採取及び、黒毛和種の生体卵巢からの経膈採卵(Ovum pick up: OPU)により行った。

と体卵巢からの採卵は、と体卵巢に存在する直径7mm以下の卵胞から注射器(注射針:21G)を用いて卵胞液と共に卵子を吸引することにより行った。

OPUは、全国農業協同組合連合会広島県本部又は当センターが所有する黒毛和種経産牛から行った。

### 2 OPU, 体外胚生産方法

OPUは、超音波画像診断装置(MyLabOne VET:メディカルタスクフォース)に卵子吸引用OPUデバイスを装着し、ディスプレイ採卵針(COVA Needle:ミサワ医科工業)と卵子吸引システムを用い、吸引圧100mmHgで卵胞液を吸引した。回収液には、0.3%ウシ胎児血清(FCS:Standard Fetal Bovine Serum:Hyclone), 0.1g力価/l硫酸カナマイシン(硫酸カナマイシン:明治)および1.8U/mlヘパリン(ノボヘパリン注:持田製薬)を添加した乳酸加リンゲル液(ハルゼンV注射液:日本全薬工業)を用いた。吸引した回収液は、フィルター(セルコレクター:富士平工業)でろ過洗浄した後に卵丘細胞卵子複合体(COC)を回収し、10%FCS添加M2培地(マウス胚培養培地)<sup>3)</sup>に移し3回以上洗浄した。

と体及びOPUにより採取したCOCは、卵丘細胞の付着程度および細胞質の状況によりグレード分けし、グレードA~C(グレードA:卵丘細胞が3層以上緊密に付着, グレードB:卵丘細胞が緊密に付着するが一部の層が薄い, グレードC:卵丘細胞が1層程度付着)までの卵子を供試卵とした<sup>3)</sup>。体外成熟はKani et alの報告<sup>4)</sup>に従い、TCM199培地(Medium199:Sigma)に10%FCS, 0.12mg/ml卵胞刺激ホルモン(FSH:アントリン10:共立製薬), 50ng/ml上皮成長因子(EGFE1264:Sigma)およびdbcAMP(ジブチリルアデノシン3', 5'-サイクリック-リン酸ナトリウム塩, D0260:Sigma), 平成31年4月以降は25ng/mlシステイン(L-Cysteine hydrochloride monohydrate, C7880:Sigma)を添加した体外成熟用培地に供試卵を移動させ、38.5℃, 5%CO<sub>2</sub>, 95%airの条件下で22~24時間成熟培養

を行った。

体外受精は、当センターの定法<sup>5)</sup>に従い、凍結精液を用いて、精子濃度を6~12×10<sup>6</sup>/mlに調整して6時間卵子と共培養することにより行った。使用した凍結精液は広島県または家畜改良事業団が所有する黒毛和種雄牛由来であり、特定の種類に偏らずに使用した。その後、ヒアルロニダーゼ(H3506:Sigma)添加M2培地中においてピペッティングすることにより卵丘細胞を除去し、M2培地で洗浄した胚を、mSOF(修正合成卵管液)(表1)に6mg/ml牛血清アルブミン(A4378:Sigma), 0.25mg/mlリノール酸アルブミン(L8384:Sigma), 0.12mg/mlグリシン(G7126:Sigma), 0.25mg/mlタウリン(T8691:Sigma)および10μL/mlITS(I1884:Sigma)を加えた培養液(SOF-ITS)中で38.5℃, 5%CO<sub>2</sub>, 5%O<sub>2</sub>, 90%N<sub>2</sub>の条件下で8日間培養した。

表1 mSOF組成

成分	含有量 (100ml中)
NaCl (191-01665:Wako)	629.4 mg
KCl (163-03545:Wako)	53.4 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (169-04245:Wako)	16.2 mg
CaCl <sub>2</sub> (038-24985:Wako)	19.0 mg
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O (135-00165:Wako)	10.0 mg
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O (1.06346.500:Merck)	4.1 mg
NaHCO <sub>3</sub> (191-01305:Wako)	210.6 mg
Sodium pyruvate (P2256:Sigma)	3.3 mg
DL-乳酸ナトリウム (31605-72:ナカライテスク)	50 μl
MEMアミノ酸溶液 (M7145:Sigma)	1000 μl
BMEアミノ酸溶液 (B6766:Sigma)	2000 μl
Gentamicin (G1272:Sigma)	500 μl
Glutamine (5908:日水製薬)	500 μl
Phenol red (P3532:Sigma)	50 μl

### 3 胚の品質調査

体外受精後6~8日目に拡張胚盤胞に発育したもののについて、IETSマニュアル<sup>6)</sup>を指標に、内細胞塊の大きさ及び栄養膜細胞の色調、変性細胞の割合を判定基準とし、内細胞塊が胞胚腔に隆起し栄養膜との境界明瞭であり、栄養膜細胞は充実し菲薄化せず、変性細胞の割合15%以下の胚を移植可能胚と判定した。

### 4 胚の凍結・融解

#### 1) 緩慢凍結法

緩慢凍結液は、ダルベッコPBS(-)粉末(05913:日水製薬)を用いて使用説明書に従い作成したダルベッコPBS溶液に5%エチレングリコール(054-00983:和光純薬), 6%プロピレングリコール(164-04996:和光純薬), 0.1Mシュークロース(196-00015:和光純薬), 0.4%牛血清アルブミン(A8022:Sigma), 20%FCSを添加したものを用いた。凍結液に移植可能胚を浸漬し、ストローに封

入して5分間平衡した後、 $-7^{\circ}\text{C}$ のアルコールバス式プログラムフリーザー (ET-1:富士平工業) に導入し、2分後に植氷、8分間保持した後、77分かけて $-30^{\circ}\text{C}$  (冷却速度 $-0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) まで緩慢冷却した。緩慢冷却後、液体窒素中にストローを浸漬することで凍結保存した。

融解はストローを液体窒素から取り出し、空気中で10秒間保持した後、 $35^{\circ}\text{C}$ の温湯中に浸漬することにより行った。

2) ガラス化保存法

i) Cryotop 法

前処理液は TCM199 培地に 10%エチレングリコール、1.0M シュウクロース、20% FCS を添加したものをを用い、ガラス化液は M2 培地に 30%エチレングリコール、20% FCS を添加したものをを用いた。前処理液に、移植可能胚を浸漬し、2分間平衡した後、ガラス化液中に移動させ60秒以内に7回以上洗浄した後、Cryotop (北里コーポレーション) の胚置載部に極少のガラス化液とともに胚を置き、液体窒素中に投入することでガラス化保存した。

融解液は、M2 培地に 0.3M シュウクロース、20% FCS を添加したものをを用いた。融解は、 $38^{\circ}\text{C}$  に加温した融解液に胚置載部を直接投入後、複数回振盪して胚を Cryotop 先端から分離させた後、2分間保持し、20% FCS を添加した M2 培地にて洗浄した。

ii) ビトラン-7 法

前処理液に、移植可能胚を浸漬し、2分間平衡した後、ガラス化液中に移動させ60秒以内に7回以上洗浄した後、ビトラン-7 スティックの胚置載部に極少のガラス化液とともに胚を置き、液体窒素中に投入することでガラス化した。ビトラン-7 ストローの黒色印部位置まで融解液を充填し、液体窒素で冷却した後、液体窒素中でビトラン-7

のスティックとストローを接合し保存した (図1)。

融解は専用のストローハンガーを用いて、液体窒素から取り出したビトラン-7 のストロー部分を  $35^{\circ}\text{C}$  の温湯で15秒間加温して融解液を融解後、スティックを押し込み、胚置載部を融解液中に浸漬し、その後、ビトラン-7 全体を温湯に60秒間浸漬することにより行った (図2)。

5 試験区の設計

1) 融解試験

供試胚は、と体由来の胚を用いた。ビトラン-7 保存胚及び Cryotop 保存胚を融解後、SOF-ITS で24時間培養した。培養後、形態的観察により生存胚率を調査するとともに、ヘキスト染色液 (bisBenzimide H 33342 B2261: SIGMA Ardrich) を用いて製品の手順書に従い一部の胚を染色し、蛍光顕微鏡下にて核数を計測することにより細胞数を調査した。

生存胚率の比較はカイ二乗検定により行い、平均細胞数の比較は、対応の無い  $t$  検定により行い、有意水準は5%とした。

2) 移植試験

供試胚は、OPU 由来の胚を用いた。ビトラン-7 保存胚及び緩慢凍結保存胚は移植現場において融解し、移植器具にセットした。Cryotop 保存胚は、実験室内で融解後、20% FCS を添加した M2 培地を用いてストローに封入し、 $38^{\circ}\text{C}$  に保温して移植現場に運搬した。受胎牛は、県内7戸の酪農経営体が飼養する発情後7~8日目のホルスタイン種未経産及び経産牛を用いた。移植は黄体側子宮内に頸管経由法により行った。妊娠診断は妊娠40日前後に、超音波画像診断装置を用いた胎心拍の確認または直腸検査による胎膜スリップの確認によって行い、受胎率を調査した。

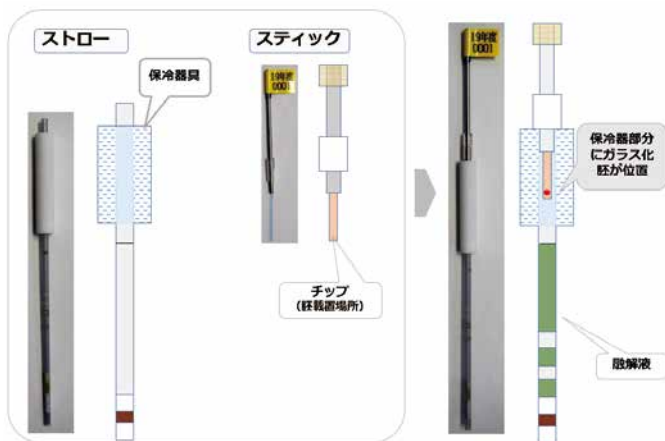


図1 ビトラン-7構造

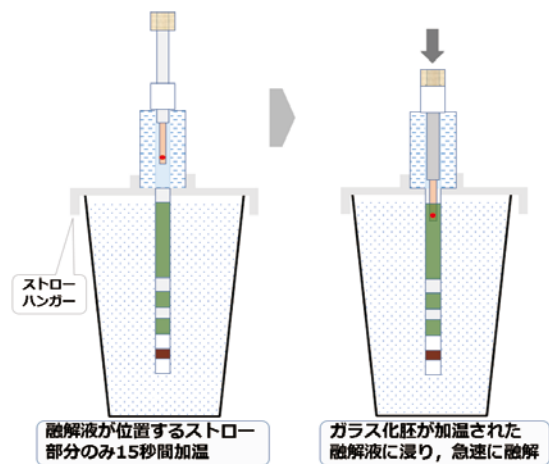


図2 ビトラン-7融解模式図

受胎率の比較は、Fisherの正確検定を実施し、水準間の比較はBonferroniの多重比較法により行い、有意水準は5%とした。統計解析はEZR (version:2.13.0)を用いて行った。

### 3) 販売胚受胎成績調査

本センターが生産・販売したOPU由来の黒毛和種体外胚のうち、令和元年4月から令和3年5月までに民間移植技術者が乳用種未経産牛へ移植した胚について調査した。ビトラン-7保存胚及び緩慢凍結保存胚は移植現場において融解し、移植器具にセットした。Cryotop保存胚は、実験室内で融解後、20%FCSを添加したM2培地を用いてストローに封入し、38℃に保温して移植現場に運搬した。新鮮胚は、20%FCSを添加したM2培地を用いてストローに封入し、38℃に保温して移植現場に運搬した。移植は発情後7~8日目に黄体側子宮内に頸管経由法により行った。妊娠診断は妊娠40日前後に、超音波画像診断装置を用いた胎仔心拍の確認または直腸検査による胎膜スリップの確認によって行い、受胎率を調査した。

受胎率の比較は、受胎の有無を目的変数、保存方法を説明変数としてロジスティック回帰分析を実施し、水準間の比較はTukeyの多重比較法により行い、有意水準は5%とした。統計解析はR (version:4.1.1)を用いて行った。

## 結 果

### 1 融解試験

融解24時間後の生存胚率(生存胚数/融解胚数)は、ビトラン-7保存胚が96.3%(52/54)、Cryotop保存胚が96.8%(61/63)であり、ビトラン-7保存胚とCryotop保存胚との間に有意差は認められなかった(表2)。

表2 ウシ体外胚における保存方法別の融解後生存胚数及び生存率

項目	ビトラン-7保存胚	Cryotop保存胚
供試数	54	63
生存数	52	61
生存率(%)	96.3	96.8

平均細胞数±標準偏差は、ビトラン-7保存胚が136.4±5.8、Cryotop保存胚が132.1±4.8であり、ビトラン-7保存胚とCryotop保存胚との間に有意差は認められなかった(表3)。

表3 ウシ体外胚における保存方法別の融解後細胞数(平均値±標準偏差)

項目	ビトラン-7保存胚	Cryotop保存胚
計測胚数	25	18
細胞数	136.4±5.8	132.1±4.8

### 2 移植試験

未経産牛の受胎率(受胎頭数/移植頭数)は、ビトラン-7保存胚が45.2%(14/31)、緩慢凍結保存胚が29.2%(7/24)、Cryotop保存胚が72.2%(13/18)であり、緩慢凍結保存胚とCryotop保存胚との間に有意差が認められた( $P < 0.05$ )(表4)。

表4 ウシ体外胚における保存方法別の未経産牛への受胎成績

項目	ビトラン-7保存胚	緩慢凍結保存胚	Cryotop保存胚
移植頭数	31	24	18
受胎頭数	14	7	13
受胎率(%)	45.2	29.2 <sup>a</sup>	72.2 <sup>b</sup>

a, b: 有意差有 ( $p < 0.05$ )

経産牛の受胎率は、ビトラン-7保存胚が53.8%(7/13)、緩慢凍結保存胚が40.0%(2/5)、Cryotop保存胚が33.3%(3/9)であり、保存区分間で有意差は認められなかった(表5)。

表5 ウシ体外胚における保存方法別の経産牛への受胎成績

項目	ビトラン-7保存胚	緩慢凍結保存胚	Cryotop保存胚
移植頭数	13	5	9
受胎頭数	7	2	3
受胎率(%)	53.8	40.0	33.3

### 3 販売胚受胎成績調査

受胎率(受胎頭数/移植頭数)は、ビトラン-7保存胚が52.3%(79/151)、緩慢凍結保存胚が14.1%(12/85)、Cryotop保存胚が49.5%(47/95)、新鮮胚が50.3%(91/181)であり、ビトラン-7保存胚、Cryotop保存胚及び新鮮胚と緩慢凍結保存胚との間に有意差が認められた( $P < 0.05$ )(表6)。

## 考 察

ビトラン-7は、受胎率の高いCryotop保存胚の移植時に必要な試験室内での融解作業を、ストロー内で再現することを目的に開発した。

Cryotopによるガラス化保存法の大きな特徴は、脱ガラス化による細胞傷害を防ぐことにある。脱ガラス

表6 生産現場におけるウシ体外胚の保存方法別受胎成績

項目	ビトラン-7保存胚	緩慢凍結保存胚	Cryotop保存胚	新鮮胚
移植頭数	151	12	95	181
受胎頭数	79	85	47	91
受胎率(%)	52.3 <sup>a</sup>	14.1 <sup>b</sup>	49.5 <sup>a</sup>	50.3 <sup>a</sup>

a, b: 有意差有 ( $p < 0.05$ )

化は、ガラス化状態の胚やその周辺の液が液体に変化する現象であり、脱ガラス化温度域（-80℃付近）を緩やかに通過した際に発生する。脱ガラス化が発生すると、細胞内に氷晶が生じ、胚は重大な傷害を受ける<sup>1)</sup>。Cryotopを用いることで、加温された融解液へ、ガラス化状態の胚を直接浸漬して超急速に加温し、脱ガラス化温度域を急速に通過させることができ、脱ガラス化することなくガラス化胚を融解することが可能となる<sup>1), 7), 8)</sup>。この現象をストロー内で再現するためには、温められた融解液と冷却されたガラス化胚をストロー内で同時に存在させる必要がある。

そこで、ビトラン-7には、空気中で45秒程度液体窒素を貯留することができる「保冷器具」をストローに装備するとともに、ガラス化胚を載せたスティックをストローの保冷器具部分に位置するよう接合できるようにした（図1）。

これにより、融解時に、融解液を吸引したストロー部分を加温している間、胚は保冷器具内の液体窒素によって-196℃程度に保たれるとともに、融解液加温後にスティックを押し込むことで、チップ上の胚が加温された融解液に浸かり、胚を超急速に加温することが可能となった（図2）。

このビトラン-7を用いた胚の融解試験及び移植試験において、ビトラン-7保存胚及びCryotop保存胚の生存胚率、平均細胞数及び受胎率は同程度であった。ビトラン-7を用いることにより、試験室内で実施しているCryotop保存胚の融解機序がストロー内において再現できるようになり、ビトラン-7保存胚の融解時に脱ガラス化による細胞傷害を防ぐことが可能となったと考えられた。

ビトラン-7を広く普及させるには、一般的な民間移植技術者が同一条件で簡易に融解できる方法を確立する必要があった。

融解時の誤操作としては、融解液を吸引したストロー部分を加温する際に、保冷器具が温水に浸り保冷機能が低下し、胚が脱ガラス化することがある。

そこで、保冷器具が物理的に引っ掛かり、温水に浸らないようにしたストローハンガーを用いた融解方法を考案した。

この融解方法をもとに、民間移植技術者への技術普及を図った結果、販売胚受胎成績において、ビトラン-7保存胚はCryotop保存胚及び新鮮胚と同程度の受胎率が得られた。ストローハンガーを用いることにより、誰もが脱ガラス化を防ぎつつ胚を融解できることが示唆された。また、民間移植技術者が主体となった胚移植において、ビトラン-7保存胚によるダイレ

クト移植が、新鮮胚及びCryotop保存胚を用いた移植と同程度の有効性をもつことが示唆された。

ビトラン-7を活用することにより、任意の日時・場所で高い受胎率が期待できるガラス化保存胚を融解・移植することが可能となった。今後は、ビトラン-7保存胚を普及させ、広島血統和牛の供給頭数拡大を推進していきたい。

## 謝 辞

試験及び胚移植事業に御協力いただいた胚移植技術者及び畜産農家の皆様、供卵牛の提供及び採卵実施に当たり御協力いただいた全国農業協同組合連合会広島県本部畜産部、卵巣採材に当たり御協力いただいた広島市食肉衛生検査所の職員の皆様に感謝いたします。

## 文 献

- 1) 一般社団法人日本家畜人工授精師協会：家畜人工授精講習会テキスト（家畜体内受精卵・家畜体外受精卵移植編），四刷，88-99，京和工業印刷，東京（2016）
- 2) 浜名克己，中尾敏彦，津曲茂久：獣医繁殖学，第3版，229-233，文永堂出版，東京（2007）
- 3) Yasuhiro, O., et al: Comparison of Two Biopsy Methods in Bovine Embryos. *Journal of Advances in Biology & Biotechnology*, 2 (1), 16-23 (2015)
- 4) Kani, C, et al: Effect of Dibutyryl cAMP Together with FSH and EGF during In Vitro Maturation on Sperm Aster Formation and Blastocyst Development after Intracytoplasmic Sperm Injection. *Journal of Mammalian Ova Research*, 28, 131-138 (2011)
- 5) 岩水 正ら：ウシ体外受精胚の凍結保存，広島県獣医学雑誌，13，59-62（1998）
- 6) Stringfellow, D.A, Seidel, SM: *Manual of the International Embryo Transfer Society (IETS)*, 3th ed, IETS, Champaign, IL (1998)
- 7) 関 信輔：細胞内氷晶形成メカニズムの解明と細胞内氷晶形成回避における融解速度の重要性，低温生物工学会誌，63No.2，77-84（2017）
- 8) Kuwayama, M., et al: Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes, *Reprod Biomed Online*, 11, 300-308 (2005)