

## 超急速凍結保存法を用いたマウス初期胚の 生存性に関する検討

新潟大学医学部産科婦人科学教室 (主任: 田中憲一教授)

七 里 和 良

Effects on the Survival of mouse preembryos cryopreserved by  
Ultrarapid method of freezing

Kazuyoshi SHICHIRI

*Department of Obstetrics and Gynecology,  
Niigata University School of Medicine, Niigata  
(Director: Prof. Kenichi TANAKA)*

The usefulness of ultrarapid freezing of mouse preembryo was investigated in comparison with conventional rapid freezing. In the present experiments, 2-cell mouse embryos were frozen under some conditions in an attempt to optimize their survival and viability in vitro.

The experiments showed that embryos exposed briefly (2 to 8 minutes) to relatively high concentrations of dimethyl sulfoxide (2 to 3.5 M) and 0.25 M sucrose survived and developed when they were plunged directly into liquid nitrogen and thawed in a 37°C waterbath and removed by one step dilution. DMSO was observed to be a better cryoprotectant than Propandiol (PROH) for ultrarapid freezing.

Mouse preembryos were cooled in a biological freezer using 1.5 M PROH as cryoprotectant. Thawing was done at room temperature and PROH was removed by multi-step dilutions.

The rate of survival and development to blastocyst of zygotes by rapid, programmed freezing using PROH was 85.7% and 45.5%, and that of 2-cell stages was 76.8% and 69.8%, respectively. Similar results were achieved by ultrarapid freezing using DMSO, i. e., the rate of survival and development to blastocyst was 89.0% and 59.2% concerning zygotes and 79.1% and 64.1% concerning 2-cell stages, respectively.

In conclusion, ultrarapid freezing was considered to be as effective as conventional rapid freezing, as evaluated by their subsequent development in vitro.

---

Key words: Cryopreservation, mouse preembryo, ultrarapid freezing, Dimethyl sulfoxide (DMSO)

凍結保存, マウス初期胚, 超急速凍結法, ジメチルスルホキシド

---

Reprint requests to: Kazuyoshi SHICHIRI  
Department of Obstetrics and Gynecology,  
Ryotsu City Hospital,  
Ryotsu, Niigata, 952, JAPAN.

別刷請求先: 〒952 新潟県両津市加茂歌代177の1  
両津市民病院産婦人科

七 里 和 良

## I. 緒 言

哺乳動物卵の凍結保存は、1971年 Whittingham ら<sup>1)</sup>がマウスを用い凍結保存に成功して以来、著しい進歩を遂げている。この凍結保存技術の成功により各種の哺乳動物卵でも応用が重ねられ、育種学的な分野における種の保存が可能となり系統維持などに利用されてきた。

さらにヒトにおいても、近年体外受精・胚移植法が重症不妊症に対する治療法として広く普及してきている。ヒト受精卵の凍結保存により、妊娠率の向上と採卵回数の減少及び多胎妊娠の回避など患者の肉体的負担が軽減され、凍結保存の重要性はより一層増してきている。1983年には、Trounson, Mohr ら<sup>2)</sup>がヒト受精卵の凍結融解胚の移植による妊娠出産例を報告して以来、欧米諸国を中心に臨床応用が続けられ、本邦においても1989年より数施設から相次いで成功例が報告された<sup>3)-5)</sup>。

しかしながらヒト受精卵の凍結融解後の胚生存率は未だ高いとは言えず、さらに凍結融解法など解決すべき問題も多い。

一般に受精卵の凍結保存法は Whittingham らの原法以来、緩慢凍結法 (slow freezing)<sup>1)2)6)</sup>が行われていたが、近年では凍結法をさらに簡便化する努力が続けられ、急速凍結法 (Rapid freezing)<sup>7)-9)</sup>が開発され、現在では広く応用されてきている。

さらに、Trounson ら<sup>10)</sup>により開発された超急速凍結法は、従来の凍結法と違い高価な凍結機器を要せず簡便でしかも極めて短時間の内に凍結が完了し比較的良好な生存性が得られることを報告した。

本研究では、マウス初期胚を用い凍結保護剤を添加後液体窒素中に直接投入する超急速凍結法の基礎的検討を行い、従来の急速凍結法<sup>11)</sup>と比較検討した。また体外受精胚移植法により得られたヒト多精子受精卵を用いて超急速凍結法のヒト受精卵への影響を検討した。

## II. 研究材料および方法

### 1. 胚採取法および培養法

F1 成熟雌マウス (BALB/C X C3H/He; 8~12週齢) に PMS (Serotropin; 帝國臓器) と HCG (Gonotropin; 持田製薬) をそれぞれ5単位ずつ48時間間隔で腹腔内投与し、HCG 投与後直ちに同系成熟雌マウスと自然交配を行った。翌日陰栓 (copulatory plug) の認められたものを胚提供マウスとした。HCG 投与から20~24時間後に前核期胚を、また40~44時間後に2細胞期胚をそれぞれ卵管灌流法により回収し凍結実験に供した。前核期胚

表 1 卵管灌流および凍結保護剤作成に用いた PBI の組成

Composition of Phosphate buffered medium (PBI)		
Components	mM	g/L
NaCl	136.87	7.990
KCl	2.68	0.200
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.90	0.132
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.47	0.200
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.49	0.0996
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8.09	1.150
Na-Pyruvate	0.33	0.036
Glucose	5.56	1.000
PC-G		0.060
BSA		3.000

BSA 濃度は以後の HTF 培養液でも 3 mg/ml とした

は 0.1% Hyaluronidase 加 PBI 溶液中で卵丘細胞を除去し、第2極体を放出した胚のみを使用した。なお卵管灌流および凍結用基礎溶媒として表 1 に示した 3 mg/ml 濃度の Bovine serum albumin (BSA; Sigma 社) を含む PBI<sup>1)</sup> をもちいた。

また、ヒト多精子受精卵は当科における体外受精胚移植プログラム<sup>12)</sup>により得られた受精卵を患者の同意を得た後、実験に用いた。

凍結融解直後の胚は、耐凍剤の除去後実体顕微鏡下に形態正常胚を同定した。引き続き、この形態正常胚を 3 mg/ml BSA を含む HTF 中<sup>13)</sup>で 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub> 中にて培養し胚盤塊への発育を観察した。

胚の生存性の検討として前核期胚では融解時に形態学的に細胞質が収縮したままで戻らないもの、膨化したもの、変色したものなどの変性卵を除いたものを生存胚とした。2細胞期以上の分割卵では同じく融解時半数以上の卵割球が正常であれば生存胚と判定した<sup>8)</sup>。

なおすべての溶液作用には Millipore 超純水製造装置による超純水を用いた。

### 2. 超急速凍結法 (Ultrarapid Freezing) の検討

胚の凍結および融解方法として室温にて凍結保護剤を添加後液体窒素中 (-196°C) に直接投入する超急速凍結法に関しマウス初期胚を用いて以下の基礎的検討を行った。

#### 1) 凍結保護剤の影響

0.25 M Sucrose を加えた 3.5 M 濃度での Dimeth

ylsulfoxide (DMSO) および Propandiol (PROH) を使用し融解後の生存率および胚発生率を比較検討した.

2) 凍結保護剤添加後の胚の平衡時間

0.25 M sucrose を加えた 3.5 M DMSO を用い、凍結保護剤添加後の胚の平衡時間をそれぞれ2~3分、4~8分、10分以上の3群に分け検討した.

3) DMSO 濃度による影響

DMSO の濃度設定として 1.0 M, 2.0 M, 3.5 M, 5.0 M の4群に分け融解後の胚生存率および発生率について検討した.

4) 凍結保護剤の除去方法

融解後の凍結保護剤の除去を 0.25 M Sucrose に5分間浸透する1段階希釈法(1-step dilution)と 0.25 M Sucrose より5分毎3段階に希釈する3段階希釈法(3 step dilution)の2法で比較検討した.

5) ヒト受精卵への影響

同様にヒト多精子受精卵を用い検討した. 凍結保護剤

として 0.25 M Sucrose を加えた 3.5 M DMSO を使用し、室温にて胚との平衡時間を2~3分とした. 胚をプラスチックストローに封入後(1ストローあたり15~20個の胚)、液体窒素中に投入. 融解は37℃の温水中で行い DMSO の除去は 0.25 M Sucrose を用いる 1 step dilution 法にて行った.

3. 急速凍結法 (Rapid Freezing) との比較検討

急速凍結法(図1)は、マウス初期胚を室温にて 1.5 M PROH さらに 0.1 M Sucrose を加えた 1.5 M PROH にそれぞれ15分間平衡させた後 0.25 ml プラスチックストロー内に封入した. Program Freezer (英国 Planner 社, R204) を用い、室温から-7℃まで2℃/min で冷却し-7℃で用手的に植水後15分間保持した. ひきつづき-35℃まで0.3℃/min で、その後さらに-190℃まで50℃/min で冷却後液体窒素中に投入した.

凍結胚の融解は、胚の入った凍結ストローを室温及び30℃微温湯中で40秒間保持する急速融解法(300℃/min)を用い、PROH の除去は Sucrose にて3段階5分毎に凍結保護剤を希釈した. PBI で洗浄後同様に胚の形態学的正常性及び胚盤胞への発生率を検討した.

4. 統計学的解析はχ<sup>2</sup>検定により行い、有意水準は5%以下を有意差ありと判定した.

III. 結 果

1. 超急速凍結法

1) 凍結保護剤の影響(表2)
マウス前核期胚および2細胞胚ともに生存率、胚発生率は PROH 群に比べ DMSO 群で有意に高率(p<0.01)であった.

2) 凍結保護剤添加後の胚の平衡時間(表3)
室温での胚との平衡時間が2~3分の群(89%; 32/36)および4~8分の群(76.5%; 29/38)に比べ10分以上平衡させた場合(50%; 20/40)には生存率が低くなり

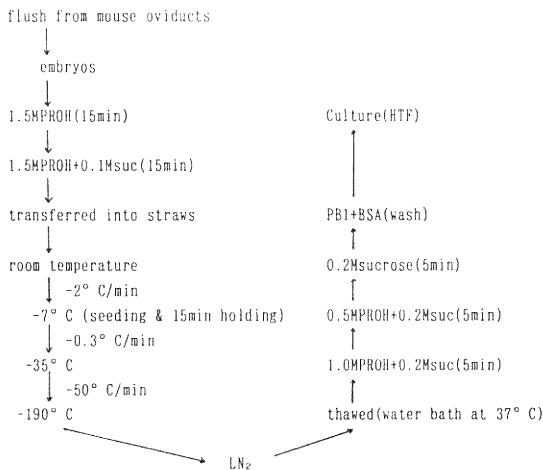


図1 急速凍結法

表2 凍結保護剤の影響 (DMSO と PROH)

embryo stage	Cryoprotectant (+0.25 Msuc)	NO. of embryos			
		frozen	recovered	survived	blastocyst
1 cell	DMSO (3.5 M)	87	85	76 (89.4%) *	42 (55.2%) *
	PROH (3.5 M)	36	36	10 (27.7%)	0
2 cell	DMSO (3.5 M)	70	69	58 (84.0%) *	43 (74.1%) *
	PROH (3.5 M)	45	43	15 (34.8%)	0

\* p<0.01 versus PROH

胚盤胞への発生を認めなかった。2～3分の群と4～8分の群は有意差を認めなかった。

3) DMSO 濃度による影響 (表 4)

2.0 M, 3.5 M の群に比べ 1.0 M, 5.0 M 濃度で生存率及び胚盤胞への発生率が有意に低下した。3.5 M と 2.0 M DMSO 群間では有意差を認めなかった。

4) 凍結保護剤の希釈法 (表 5)

0.25 M Sucrose による 1-step dilution と 0.25 M

Sucrose より3段階に希釈する 3 Step dilution 法では両群間で融解後の生存率及び胚盤胞への発生率に有意差を認めなかった。

5) ヒト多精子受精卵への影響 (表 6)

6 コと少数例の検討であるが、凍結融解後に 5 コ (83.3%) が正常形態を示し、2 コ (40%) が胚盤胞へ発生した。

表 3 凍結保護剤添加後の胚の平衡時間と融解後の胚発生率 (マウス 2 細胞期胚)

Equilibration time	cryoprotectant (+0.25 Msuc)	NO. of embryos			
		frozen	recovered	survived	blastocyst
2~3 min	DMSO (3.5 M)	40	36	32 (89%) *	24 (75%) *
4~8 min	DMSO (3.5 M)	40	38	29 (76.5%) **	12 (51.7%) *
10 min <	DMSO (3.5 M)	40	40	20 (50%)	0

\* p<0.01 versus 10 min <    \*\* p<0.05 versus 10 min <

表 4 DMSO の濃度による融解後の胚発生率 (マウス 2 細胞期)

DMSO concentration (+0.25 Msuc)	embryo stage	NO. of embryos			
		frozen	recovered	survived	blastocyst
1.0 M	2 cell	40	38	19 (50.0%)	6 (31.5%)
2.0 M	2 cell	33	29	22 (75.8%) *	15 (68%) *
3.5 M	2 cell	70	69	55 (80.0%) **	42 (75%) *
5.0 M	2 cell	40	40	28 (70%) <sup>n.s</sup>	12 (42.8%) <sup>n.s</sup>

\* p<0.01    \*\* p<0.05    n.s; not significant versus 1.0 M DMSO

表 5 凍結保護剤の希釈方法 (マウス 2 細胞期)

Dilution method	embryo stage	NO. of embryos			
		frozen	recovered	survived	blastocyst
1-step	2 cell	40	36	32 (89%) ↘ 1	24 (75%) ↘ 2
3-step	2 cell	30	28	23 (80%) ↗	15 (65%) ↗

(1, 2 : N, S)

表 6 超急速凍結保存の成績

embryo stage	Cryoprotectant (+0.25 Msuc)	NO. of embryos			
		frozen	recovered	survived	blastocyst
1 cell (mouse)	DMSO (3.5 M)	103	98	84 (85.7%)	38 (45.3%)
2 cell (mouse)	DMSO (3.5 M)	108	95	73 (76.8%)	51 (69.8%)
3 PN (human)	DMSO (3.5 M)	6	6	5 (83.3%)	2 (48%)

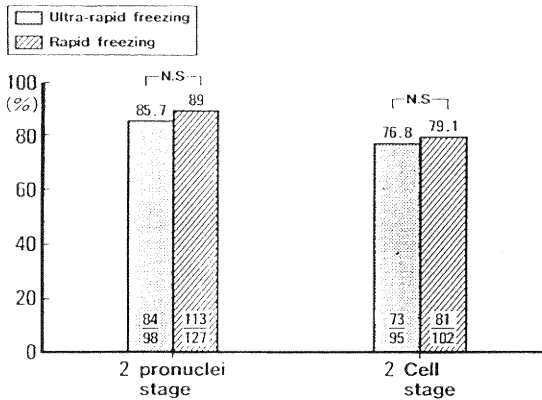


図2 超急速法および急速法による凍結融解後の形態学的正常胚の全回収胚に対する割合

## 2. 急速凍結法との比較

マウス初期胚を使用し超急速凍結法の成績と従来の急速凍結法と比較検討した。

凍結融解直後の形態正常胚の割合は、マウス前核期胚では超急速法で85.7% (84/98)、急速法で89% (113/127)であり、2細胞期胚ではそれぞれ76.8% (73/95)、79.1% (81/102)と両群間で有意差を認めなかった(図2)。

形態正常胚を追加培養し胚盤胞へ発生した割合は前核期胚では超急速法で45.3% (38/84)、急速法で59.2% (67/113)であり、2細胞期胚ではそれぞれ69.8% (51/73)、64.1% (52/81)と同じく両群間で有意差を認めなかった(図3)。

## IV. 考 案

受精卵の凍結保存に関する研究はWhittingham<sup>1)</sup>以来、数多くの試みられてきた。

一般に凍結保存において胚の生存性に影響を及ぼす主たる因子として①凍結時の胚の発生段階②凍結および融解の方法③凍結保護剤の種類などが考えられている<sup>14)</sup>。

従来より②の凍結融解法に関しては、大別して緩慢凍結法<sup>1)2)6)</sup>(-80℃まで毎分-0.3℃で冷却、その後液体窒素中に投入)、急速凍結法<sup>7)9)</sup>(-40℃まで毎分-0.3℃で冷却、その後液体窒素中に投入)、Vitrification法<sup>15)16)</sup>(室温より直接液体窒素中に投入)の3種類の方法が行われてきた。しかしながら、これら3法はそれぞれ有利、不利な点を有しており緩慢凍結法は比較的安定した成績を得ているものの凍結融解操作に長時間を要することが最大の欠点である。

またVitrification法は、操作に要する時間は短縮さ

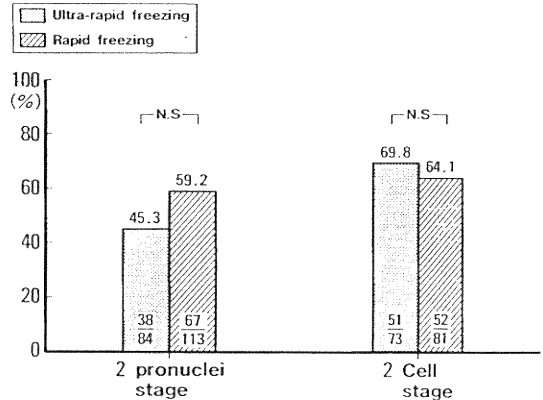


図3 凍結融解後の生存胚を培養し、胚盤胞への発生率

れた反面、高濃度の凍結保護剤(13モル)を使用するために液体窒素に浸漬する前に低温下で順次高張液中に胚を移すという煩雑な操作を行わなければならない必ずしも良好な凍結法とは言い難い。これらのことから現在、急速凍結法がその簡便性と比較的安定した成績を得ることから広く用いられている。Trousnonら<sup>10)</sup>は、体内受精由来マウス胚を保存液に移しストロー内に封入した後、直接液体窒素中に浸漬する超急速凍結法を考案し胚の凍結保存に成功している。しかしながら従来の報告の多くは4細胞期以降のものであり、より早期の受精卵についての報告は少ない。本研究では超急速凍結法の基礎的検討として①の胚の発生段階をマウス2細胞期胚を用いて検討した。なぜなら凍結融解に対する感受性は早期の胚ほど高く<sup>17)</sup>、またヒト体外受精において長期の体外培養により胚の劣化をきたしやすきこと<sup>18)</sup>から初期胚の凍結保存での検討が実際上重要と思われる。また超急速凍結法における凍結保護剤の影響に関して検討を加えた。

本実験結果より、超急速凍結法においては凍結保護剤としてPROHにくらべDMSOの使用により成績が向上した。Auweraら<sup>19)</sup>も超急速法においてPROH、およびDMSOとの混合溶液(1:1)を耐凍剤として検討しているが同様の成績の低下を報告している。一般に冷却時の凍結障害を抑えるために溶媒に加える凍結保護剤には、分子量が小さく細胞内透過性があるもの(PROH, DMSO, Glycerolなど)と分子量の大きな非透過性のもの(Sucrose, Polyvinyl pyrrolidoneなど)とがある。前者は細胞内に入り細胞質の塩濃度を高めることで共晶点を低下させ、細胞膜や細胞内蛋白を保

護する作用があると考えられる。また後者は溶媒の濃度を上昇させることで、その浸透圧差により細胞内自由水の脱水を促進すると考えられる。超急速凍結法における PROH の使用は透過性の高い PROH と非透過型の sucrose との相互作用により、短時間でも過度の脱水がおこり細胞内浸透圧上昇による細胞障害が引き起こされたためと考えられる。さらに PROH の使用により、DMSO 使用時に認めなかった凍結ストローの破損や溶液のガラス化により融解時に多くの胚の変性が起こることが本実験でも観察された。

室温での胚との至適平衡時間に関しては、10分以上平衡させた場合有意に融解後の胚の生存率および胚発生率が低下した。このことは DMSO と胚との平衡時間の増大により過度の脱水や DMSO 自体の持つ細胞毒性の増強などの影響が考えられる。DMSO の至適濃度に関しては、2 M, 3.5 Mol 群で成績は良好であり 5 M, 1 Mol 群では成績が低下した。一方凍結保護剤の希釈法では、現在緩慢および急速凍結法では段階的希釈法が行われているが、本実験では 0.25 M Sucrose による 1 段階希釈法と徐々に段階的に希釈していく 3 段階希釈法の 2 法で検討したが両者の方法間に有意差を見いだせなかった。

つぎに耐凍剤を段階的に添加する急速凍結法<sup>11)</sup>との比較検討では、マウス前核期胚および 2 細胞期胚ともに融解後の胚生存率および発生率ともに有意差を認めず同様の高い成績が得られた。一般に凍結障害は、細胞内自由水の凍結による氷晶化が原因で起こる物理的細胞障害と脱水による浸透圧衝撃や高塩類濃度による蛋白質の変性(溶液効果)によっておこるという二要因仮説を Mazur<sup>20)</sup>は提唱した。すなわち緩慢冷却では脱水が十分に行われるが、細胞膜や細胞質は高塩分濃度にさらされしかも脱水による収縮のため浸透圧衝撃を受ける。一方急速凍結では細胞内自由水の脱水が十分に行われなため細胞内氷晶形成を生じ細胞を物理的に傷害すると言われている。初期胚ほど個々の割球が大きいため細胞内自由水の十分な脱水は短時間では困難とされているが、超急速凍結法においては急速凍結法(1.5 Mol 濃度)より高濃度の DMSO および Sucrose との併用により短時間で細胞内氷晶形成を起こさないほどの脱水が可能であるという報告がある<sup>10)</sup>。

さらにヒト受精卵(130  $\mu\phi$ )は、マウス受精卵(75  $\mu\phi$ )に比べ大きな細胞であるためより脱水しがたい細胞の一つである。今回少数例ながらヒト多精子受精卵を用いた検討では、融解後83%が正常形態を示し40%が胚盤胞へ

発生した。Gordts<sup>21)</sup>も 2.5 M DMSO 濃度で同様の検討を行い 89.5% (17/19) の生存胚と 71.0% (12/17) の分割率を得ている。

従って超急速凍結法は非常に短時間で操作が完了し、かつ簡便な方法であり、マウス初期胚での検討では従来行われてきた急速凍結法と同等の高い胚生存率と胚盤胞への発生率が得られたことから有用な方法であることが明らかとなった。さらに超急速凍結法のヒト受精卵への応用の可能性を示唆した。しかしながら本法によるヒト染色体への影響については詳細な報告は少なく、臨床応用に当たっては安全性について今後さらに検討が必要であると考えられる。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導御校閲を賜りました田中憲一教授に深甚なる謝意を表します。また直接御指導いただきました谷 啓光先生に感謝いたします。

なお、本論文要旨の一部は第43回日本産科婦人科学会学術講演会(平成3年3月、京都)において発表した。

## 参 考 文 献

- 1) Whittingham, D.G., Libo, S.P. and Mazur, P.: Survival of mouse embryos frozen to  $-196$  degree and  $-269$  degree. *Science*, **178**: 441, 1972.
- 2) Trounson, A. and Mohr, L.: Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature*, **305**: 707, 1983.
- 3) Aoki, R., Oda, T., Yoshimura, S., Matsumoto, T., Natori, M., Ono, T. and Iizuka, R.: Successful Pregnancy from Cryopreserved Human Embryos: Japan's First Cases. *J. Fertil Implant (Tokyo)*, **7**: 229, 1990.
- 4) 佐藤文彦, 斉藤英和, 沼崎政良, 小池数与, 椎名有二, 斉藤隆和, 広井正彦: ヒト受精卵凍結保存の成績と妊娠例の検討. *日本受精着床学会雑誌*, **7**: 29, 1990.
- 5) 七里和良, 谷 啓光, 平沢浩文, 荒川 修, 田中憲一: 刺激周期を用いたヒト凍結胚移植の成績. *日本受精着床学会雑誌*, **9**: 1992 (掲載予定).
- 6) Cohen, J., Simons, R.F., Fehilly, C.B. and Edwards, R.G.: Factors affecting survival and implantation of cryopreserved human embryos.

- J, *In Vitro Embryo Transfer*, **2**: 1, 1985.
- 7) **Whittingham, D.G., Wood, M., Farrant, J., Lee, H. and Halsey, J.A.**: Survival of frozen mouse embryos after rapid thawing form  $-196^{\circ}\text{C}$ . *J. Reprod. Fert.*, **56**: 11~12, 1979.
- 8) **Mohr, L.A., Trounson, A. and Freemann, L.**: Deep freezing and transfer of human embryos. *J. In Vitro Embryo Transfer*, **2**: 1, 1985.
- 9) **Lassalle, B., Testart, J. and Renard, J.P.**: Human embryo features that influence the success of cryopreservation with the use of 1,2-propan diol. *Fertil. Steril.*, **44**: 645, 1985.
- 10) **Trounson, A., Peura, A. and Kirby, C.**: Ultrarapid freezing; a now low cost and effective method of embryo cryopreservation. *Fertil. Steril.*, **48**: 843, 1987.
- 11) **Testart, J., Lassalle, B., Belaisch-Allart, J., Hazout, A., Forman, R., Rainhorn, J.D. and Fryman, R.**: High pregnancy rate after early human embryo freezing. *Fertil. Steril.*, **46**: 286, 1986.
- 12) 谷 啓光, 佐藤芳昭, 織田和哉, 七里和良, 荒川修, 竹内正七: ブセレリンを併用した卵巣刺激法による体外受精・胚移植の試み. *日不妊会誌*, **34**: 413, 1989.
- 13) **Qinn, P., Kerin, T.F. and Warnes, G.M.**: Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertil. Steril.*, **44**: 493, 1985.
- 14) **Friedler, S., Guidice, L.C. and Lamb, E.J.**: Cryopreservation of embryos and ova. *Fertil. Steril.*, **49**: 5, 743, 1988.
- 15) **Rall, W.F. and Fahy, G.M.**: Ice free cryopreservation of mouse embryos at  $-196^{\circ}\text{C}$  by vitrification, *Nature*, **313**: 573, 1985.
- 16) **Rall, W.F.**: Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification, *Cryobiology*, **24**: 387, 1987.
- 17) **Mohr, L.R. and Trounson, A.**: Structural changes associated with freezing of bovine embryos. *Biol. Reprod.*, **25**: 1009, 1981.
- 18) **Nayuda, P.L., Cook, D.A., Lopata, A., Sheather, S.J., Lloyd-Smith, C.W., Cadusch, P. and Johnston, W.I.H.**: Follicular characteristics associated with viable pregnancy after in vitro fertilization in humans. *Gamate, Res.*, **18**: 37, 1987.
- 19) **Auwers, I.V., Freddy, C., Ronay, O., Robert, P. and Phillippe, R.K.**: Cryopreservation of Pronuclate mouse ova; slow versus ultrarapid freezing. *Human, Reprod.*, **5**: 619, 1990.
- 20) **Mazur, P.**: The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rate. *Cryobiology.*, **14**: 251, 1977.
- 21) **Gordts, S., Roziars, P., Campo, R. and Noto, V.**: Survival and pregnancy outcome after ultrarapid freezing of human embryos. *Fertil. Steril.*, **53**: 469, 1990.

(平成4年2月12日受付)