

肉牛受精卵 簡易凍結 및 融解方法에 관한 研究
第七報 . 液體窒素 Container 에서 凍結時 諸植水方法이
Mouse 受精卵의 生存率에 미치는 影響

金重桂 · 姜萬鍾 · 金瑩勲 · 張德支 · 康珉秀 · 金承浩

濟州大學校 農科大學

Studies on Simplified Procedures for Freezing and Thawing of Bovine Embryos

VII. Effects of seeding procedures in a liquid nitrogen container on
the survival rate of mouse embryos

Kim, J. K., K. H. Lee, M. J. Kang, Y. H. Kim, S. H. Moon and S. H. Kim

College of Agriculture, Cheju National University

Summary

This study was done with mouse embryos to determine effects of the freezing media with or without 10% sucrose, and seeding methods (pincette, no seeding, liquid nitrogen gas phase and copper wire coiled straw) on embryo survival were determined using the FDA test.

The summarized results are the following.

1. The FDA score found with copper wire coiled straw, no seeding, pincette and liquid nitrogen gas phase was 3.6, 3.6, 3.3 and 3.0, respectively. There were no significant differences.
2. The embryo score shows higher ($P < 0.05$) survival rate using a freezing medium with sucrose than the one without it. Among the seeding procedures, better results are copper wire coiled straw and no seeded.
3. The results suggest that copper wire coiled seeding no seeding be as good as seeding when the mouse embryos were frozen in a liquid nitrogen container using both the freezing and dilution media containing 10% sucrose.

I. 緒 論

受精卵의 凍結過程에 있어서 植水 (seeding) 은 Whittingham 等 (1972) 이 mouse 受精卵 凍結에서 最初로 利用하였으며, 卵子는 精子와 달리 水分含量이 많고 特殊한 膜構造 (透明帶) 를 갖고 있기 때문에 植水하지 않으면 過冷却으로부터 세포질內에 氷晶이 形成되어서 急速한 溫度上昇 (潛在熱發生) 이 생겨 세포질에 物理的 衝激을 주게 되어 傷害를 입게 되므로 卵子凍結時 植水은 꼭 施行하여야 하는 것이다.

또한 Leibo 와 Mazur (1978) 은 植水을 하므로서

-5~-15°C 에서 細胞에 害를 주는 過冷却을 짧게 하기 위하여 straw 內 氷結晶을 強制로 形成시키는 것으로 過冷却中 脫水가 유발되어 液狀에서 固體로 轉換될 때 潛在熱發散에 依한 sample 의 溫度上昇 (plateau) 의 發生을 防止한다고 보고하였다.

植水方法은 Elsdon 과 Seidel (1982) 以後, 主로 cooled forcep 으로 遂行되어 왔으며, Kasai 等 (1980) 은 -7°C 에서 液體窒素 gas 로, Kasai 等 (1984) 은 dry ice 로, Massip 等 (1982) 과 Nieman 等 (1985) 은 液體窒素를 bowling 하면서 Miyamoto 等 (1986) 은 ice crystal 로, Suzuki 等 (1985) 은 seeding chamber 를 별도로 만들어 cooled forcep 으로 各各 植水을

註) 本 研究은 1986년도 韓國科學財團의 지원에 의하여 수행되었음.

試圖하였다.

그러나 Bui-Xuan-Nguyen 등(1984)은凍結用液에 sucrose를添加하면受精卵이凍結하기전에脫水되기 때문에植水하지 않고急速凍結하더라도受精卵의 높은生存率을 얻을 수 있다고 하였고, 이외에도 여러 연구가 이루어지고 있다(Krag 등, 1985; Williams, 1983).

本研究은以前에發表된(第IV報)家兔受精卵에서 얻은結果를再確認하기爲하여 10% sucrose를凍結用液에添加할때植水하지 않은것, pincette植水, 液體窒素蒸氣植水 그리고銅線을 straw에 감고植水を誘導하는方法 등으로區分하였으며液體窒素 container에서凍結速度別로凍結한後融解即時 FDA-test로生存率을比較하여大家畜受精卵凍結에利用하고자實施하였다.

II. 材料 및 方法

供試動物은 ICR계 mouse를利用하였으며飼養管理는配合飼料를自由給食하였다.

過排卵誘起를爲하여 PMSG(5~10IU)를腹腔內에注射하고, 48時間後同量의 HCG를同一한方法으로注射한 다음同一系統의雄性 mouse를合券하여自然交尾를誘導하였으며翌日아침陰에서陰栓(coital plug)을確認하여,陰栓이確認되지 않은個體는本試驗에서除外시켰다.

受精卵의採卵은 HCG注射後 72~80時間에屠殺하여,子宮 및卵管을體外로摘出하고 1ml注射器를利用하여灌流液을子宮의 한쪽끝에서注入하여 watching glass內로回收하였다.

이때使用된灌流液은 m-PBS로使用前에 0.2 μ m millipor filter로濾過시켜無菌處理하였다.

採卵된受精卵은 40倍實體顯微鏡下에서形態의으로優秀한卵子를選別하여新鮮 PBS로 2~3회洗滌한後試驗에利用하였으며未受精卵 및異常卵은試驗對象에서除外시켰다.

卵子凍結用液은 10% glycerol 10% sucrose와非動化시킨 20% donor serum을含有하고 있는 PBS와 10% sucrose를除外한 10% glycerol과 20% donor serum을添加한 PBS를利用하였다.

Glycerol添加는 Leibo(1984)가使用한方法과同一한方法으로卵子를直接凍結用液에 옮겨平衡하는 one-step으로添加한후 0.25ml plastic straw

에氣泡(air bubble)를 2個所 만들어 그 사이에受精卵을注入한後 straw powder로封印하였다(第6報; Fig. 1).

封印된 straw를 곧바로液體窒素(LN₂) container로 옮겨凍結을實施하였으며溫度確認은自動細胞凍結器(R-204 cell freezer, planer products England)의 sensor에凍結液으로 채운 0.5ml straw를 끼워서固定後使用하여 Auto recorder로溫度確認을 하였다.

凍結速度는 다음과 같이 4가지로區分하여實施하였다.

1-F; 常溫에서 -7℃까지는 1℃/min 下降시킨後植水(seeding)하고, 5分 동안定置한 다음 -35℃까지는 0.3℃/min씩下降하여 LN₂ container에浸漬保存하였다.

2-F; 植水後 5分定置까지는 "1-F"와 같고 -35℃까지는 3℃/min 下降시킨 다음 -80℃까지는 5℃/min씩凍結하여液體窒素에浸漬保存하였다.

3-F; 植水後 5分定置까지는 "1-F"와 같고 -80℃까지는 15℃/min씩凍結하여液體窒素에浸漬保存하였다.

4-F; 植水後 5分間定置까지는 "1-F"와 같고즉시液體窒素表面 3~5mm까지下降시켜 5分間定置시켰다가 -96℃에浸漬시켰다.

植水方法은 p-seeding(핀셋植水), N-seeding(植水 아니한 것), LN₂-seeding(液體窒素蒸氣植水), co-seeding(銅線植水)으로區分하여實施하였는데 P-seeding은 pincette로受精卵이 들어있는 straw上位部를接觸시켜氷結晶이 나타날 때까지實施하였으며(Elsden과 Seidel, 1982), LN₂-seeding은 -7℃일때液體窒素表面의上面 2~5mm까지瞬間적으로下降시켰다 올렸으며 이때下降溫度는約 -12℃前後(sensor溫度)되도록 하였다.

Co-seeding은 1mm銅線을 straw 밑에서부터 5mm間隔으로 윗부분까지 감아서 -7℃일때 LN₂-seeding과同一한方法으로植水を試圖하였다.

受精卵의融解는 38℃水槽에서 straw를 천천히흔들어氷結晶이 사라질 때까지實施하였는데所要時間은約 10秒程度였다.

Glycerol除去는添加方法과同一한 one-step方法으로 glycerol除去用液(PBS+10% sucrose)에直接 옮겨 5分間平衡시켜 glycerol을除去하였다.

受精卵의生死判定은 Schilling等(1982)의方法으

로 FDA(3',6'-diacetyl fluorescence)를 利用하여 第 5 報와 同一한 方法으로 判定하였다.

Ⅲ. 結果 및 考察

10% sucrose를 添加한 後 LN₂ container에서 凍 結速度와 여러가지 植氷方法에 따른 mouse 受精卵의 生存率을 FDA-test에 依하여 比較한 成績은 Table 1 과 같다.

1-F(緩慢凍結)에서 FDA score는 N-seeding이 平均 3.8(76%), P-seeding;3.8(76%), LN₂-seed- ing;3.7(74%)이며 Co-seeding은 3.9(78%)로 1-F에서 가장 좋은 成績이며 N-seeding과 P-seeding

은 同一한 成績을 나타내고 있다.

그리고 2-F(急緩凍結)에서는 N-seeding, P-seeding, LN₂-seeding, Co-seeding이 各各 2.9, 2.9(58%), 3.1, 3.1(62%),로 他 凍結보다 低調한 成績을 보여주고 있으며, 3-F(急速凍結)에서는 N-seeding;3.7(74%), P-seeding;3.4(68%), Co-seeding;3.9(78%)로 Co-seeding이 가장 좋은 成績을 나타내고 있으며 P-seeding과 LN₂-seeding은 同一한 數値를 보여주고 있다.

4-F(超急速凍結)는 N-seeding;3.3(66%), P-seeding;3.2(64%), LN₂-seeding;2.4(48%)이며 Co-seeding은 4.0(80%)으로 가장 優秀하였고 LN₂-seeding은 가장 不良한 成績이었다.

Table 1. Effects of seeding procedures according to freezing procedures by LN₂ container on mouse embryos survival evaluated by FDA-test

Freezing procedure	Methods of seeding	No. of embryos frozen	No. and(%) of survival embryos evaluated by FDA-test				Score
			P-5	P-3	P-1	N-0	
1-F ^a	N-S	70	41(58.6)	18(25.7)	8(11.4)	3(4.3)	3.8
	P-S	78	49(62.8)	16(20.5)	5(6.4)	8(10.3)	3.8
	LN ₂ -S	39	24(61.5)	7(17.9)	4(10.3)	4(10.3)	3.7
	Co-S	32	22(68.8)	3(9.4)	7(21.9)	0(0.0)	3.9
2-F ^b	N-S	76	34(44.7)	14(18.4)	8(10.5)	20(26.3)	2.9
	P-S	84	31(36.9)	25(29.8)	5(6.0)	23(27.4)	2.9
	LN ₂ -S	94	38(40.4)	23(24.5)	7(7.4)	26(27.7)	3.1
	Co-S	51	23(45.1)	13(25.5)	5(9.8)	10(19.6)	3.1
3-F ^c	N-S	100	55(55)	30(30)	0(0)	15(15)	3.7
	P-S	73	29(39.7)	34(46.6)	1(1.4)	9(12.3)	3.4
	LN ₂ -S	30	15(50)	7(23.3)	5(16.7)	3(10)	3.4
	Co-S	28	15(53.6)	10(35.7)	3(10.7)	0(0)	3.9
4-F ^d	N-S	65	32(49.2)	14(21.5)	12(18.5)	7(10.8)	3.3
	P-S	70	27(38.6)	29(41.4)	5(7.1)	9(12.9)	3.2
	LN ₂ -S	28	5(17.9)	11(39.3)	8(28.6)	4(14.3)	2.4
	Co-S	21	15(71.4)	1(4.3)	0(0)	3(14.3)	4.0

^a; Room temp. → -7°C (1°C/min) 5 min seeding → -35°C (0.3°C/min) → -196°C
^b; Room temp. → -7°C (1°C/min) 5 min seeding → -35°C (3°C/min) → -80°C (5°C/min) → -196°C
^c; Room temp. → -7°C (1°C/min) 5 min seeding → -80°C (15°C/min) → -196°C
^d; Room temp. → -7°C (1°C/min) 5 min seeding → Rapid freezing by LN₂ vapour for 5 min → -196°C
 N-S; Non-seeded P-S; Pincette-seeded LN₂-S; Liquid nitrogen seeded Co-S; Copper wire seeded

이러한 결과에 있어서 Co-seeding이 각凍結處理에서 대체로優秀하지만實驗卵子數가 적으므로再檢討가 必要하다.

여기서銅線植水은液體窒素上面에서溫度傳達이 빨라서全體 straw에 均一하게急冷却되어自然植水된 것으로 생각된다. 그리고 P-seeding에서는 seeding하기爲하여 straw를空氣中에露出시켜야하므로 sample의溫度上昇때문에成績이低調한 것으로 思料된다.

한편 LN₂-seeding에서 가장 낮은數値를 보인것은植水을 하기爲해서 container로下降시킬 때간혹液體窒素에 straw가瞬間적으로接觸하면서溫度下降이 -15℃以下로떨어지는境遇受精卵生存率低下를 나타낸理由로 들 수 있다.

Table 2는凍結用液에 sucrose를添加한 것(PG-S)과添加하지 않은 것(PG)으로區分하여植水方法에 따라 FDA-test로 mouse受精卵의生存率을比較한 것으로서 N-seeding에 있어서는 PG가平均 score 3.0(60%)으로 PGS의 3.8(76%)보다低調한成績을, P-seeding은 PG와 PGS가同一하게 3.3(66%)의 score를 보여주고 있다.

또한 LN₂-seeding에 있어서는 PG와 PGS가同一한 3.0(60%)의 score를提示하고 있으나 Co-seeding에서는 PG가 2.9(58%), PGS 3.9(78%)로 sucrose를添加한 것이優秀한成績을 보여주고 있다(P<0.05).

本成績을相互比較하여 보면 sucrose를添加하지 않았을境遇는 P-seeding이 N-seeding, LN₂-seeding, Co-seeding보다傷秀하였으며, sucrose를添加할境遇에 있어서는 seeding을 하지 않아도他植水方法보다優秀하였고 특히 Co-seeding이良好하였다.

그러므로 LN₂ container에서는 sucrose를添加하므로서植水을 하지 않아도 mouse凍結卵生存率에는 큰關係가 없는 것을 보여주었다.

여러가지植水方法을綜合적으로分析한 것은 Table 3에서 보여주는 바와 같이 N-seeding은 P-5가 54.2%, P-3;25.1%이며 N-0;10.5%로平均 3.6(72%)의 score를 나타내고 있으며, P-seeding에 있어서 P-5가 44.6%, P-3;33.5%, N-0 16.8%로平均 score 3.3(66%)을 보여주고 있다. 한편 LN₂-seeding은 P-5가 42.9%, P-3;25.1%,

Table 2. Effects of freezing media according to seeding procedures on mouse embryos survival evaluated by FDA

Method of seeding	Freezing medium	No. of embryos frozen	No. and (%) of survival evaluated by FDA-test				Score
			P-5	P-3	P-1	N-0	
N-S	PG	83	36 (43.4)	19 (22.9)	10 (12.0)	18 (21.7)	3.0
	PGS	223	126 (56.5)	57 (25.6)	18 (8.1)	22 (9.9)	3.8
P-S	PG	92	37 (40.2)	37 (40.2)	3 (3.3)	15 (16.3)	3.3
	PGS	207	93 (44.9)	65 (31.4)	15 (7.2)	34 (16.4)	3.3
LN ₂ -S	PG	46	19 (41.3)	13 (28.3)	4 (8.7)	10 (21.7)	3.0
	PGS	137	59 (43.1)	32 (23.4)	19 (13.9)	27 (19.7)	3.0
Co-S	PG	39	13 (33.3)	14 (35.9)	6 (15.4)	6 (15.4)	2.9
	PGS	87	55 (63.2)	18 (20.7)	10 (11.5)	4 (4.6)	3.9

PG;PBS+10% glycerol PGS;PBS+10% glycerol+10% sucrose

N-S;Not seeded P-S;Pincette seeded LN₂-S;Liquid nitrogen vapour seeded Co-S;Copper wire seeded

Table 3. Effects of seeding procedures on mouse embryos survival evaluated by FDA-test

Method of seeding	No. of embryos frozen	No. and (%) of survival embryos evaluated by FDA-test				Score
		P-5	P-3	P-1	N-0	
N-S	275	149 (54.2)	69 (25.1)	28 (10.2)	29 (10.5)	3.6
P-S	316	141 (44.6)	106 (33.5)	16 (5.1)	53 (16.8)	3.3
LN ₂ -S	191	82 (42.9)	48 (25.1)	24 (12.6)	37 (19.4)	3.1
Co-S	116	64 (56.0)	27 (23.3)	13 (11.2)	11 (9.5)	3.6

N-S; Not seeded. P-S; Pincette seeded.
LN₂-S; Liquid nitrogen vapour seeded. Co-S; Copper wire seeded.

N-0; 19.4%의 생존율을 보여 score 3.1(61%)의 가장不良한成績을 보이고 있다.

그리고 Co-seeding에서는 P-5가 56.0%로 P-3가 23.3%, N-0 9.5%로 平均 score 3.6(72%)로 가장優秀하였으나處理別有意성이 없었다.

여기서 N-seeding이 P-seeding보다良好한 것은家兔(第4報)에서도 같은結果를提示하여 주었는데 sucrose添加의原因도 있겠으나植氷方法中 straw氣泡(air bubble) 2個가存在하여 이곳이 먼저冷却되어液狀部에傳達되므로自然植氷이 된것이 아닌가思料되며 이것은 앞으로 더試驗이施行되어야 할課題인 것이다.

本研究를綜合적으로考察하여 보면 Whittingham(1972)이 mouse에서 -3.5~-4.5°C 사이에植氷하여 좋은成績이 얻어진以後必히遂行하여야 되는 것으로認識되어 이제까지大部分 Elsdon과 Seidel(1980)의方法인 cooled forcep으로植氷되어왔다.

그런데 이러한過程은復雜하고,自動式이 아닐 때는 항상空氣에露出시켜야 하므로 잘못施行하였을 때는 오히려 sample의溫度上昇을誘導시킬可能性이 있다고井上等(1982)이 보고하였다.

Leibo와 Mazur(1978)에 따르면植氷을 하므로서氷結晶을誘導시켜過冷却期間을 짧게 하고 sample溫度上昇(plateau)의被害를 막을 수 있다고 하였다.

그리고 Massip等(1980)이耐凍劑에 sucrose를添加시킨 이후 Miyamoto와 Ishibashi(1983)는 mouse受精卵에서 dry ice로凍結한境遇 seeding하지

아니하였을 때 언제氷晶核이發生하는지는試驗하지 아니하였지만 one-step addition(glycerol)에서는植氷을 하지 않는 것이 stepwise方法으로漸次 glycerol을添加했을 때는植氷을 하지 않을 때가 성적이 향상되었다는 보고와本成績과一致하였으며, 1986年度에는 LN₂ gas로凍結할境遇 seeded와 not seeded區와는耐凍劑平衡時間이 5分以後부터는 거의差異가 없이(glycerol 2.0M일때) 80~85%로 높은生存율을 보고하고 있다.

Krag等(1985)은 murine受精卵에서 그리고 Miyamoto等(1986)도 mouse受精卵을 얼음(氷)으로植氷할 때生存율이 73~82%,植氷하지 않은 것이 57~61%로서本成績과相反되는傾向이 나타났다. 그리고 Bui-Xuan-Nguyen等(1984)은 bovine受精卵에서 sucrose를添加하여植氷하지 않고 81.8%의生存율을, 그리고 William과 Johnson(1986)도 mouse受精卵으로 80%前後의生存율을 얻음으로서 거의一致하고 있다.

그러나 Szell과 Shelton(1986a, 1986b, 1987)의 90%前後의生存율보다는低調한成績이었다.

그러므로前述한 바와 같이 10% sucrose를添加할때植氷하지 않아도 된다는 것을本研究의結果에서再立證되고 있다. 그런데動物種類에 의한受精卵크기,耐凍劑의種類 및濃度, 卵子發育段階,凍結速度와凍結器具,植氷方法等에依해서 많은變異가 있는 것으로思料되어繼續究明이必要하며大家畜, 특히牛와受精卵凍結에應用하여繼續試驗을 갖고자 한다.

IV. 摘要

Sucrose를凍結液과除去液에添加하여液體窒素(LN₂) container에서凍結할 때,植氷하지 않은 것, pincette로植氷,液體窒素蒸氣로植氷,구리줄로 straw를감아서植氷한 것 등으로區分하여凍結速度에 따라 FDA test로生存率을比較한結果를要約하면 다음과 같다.

1. Sucrose添加와 함께 LN₂ container에서凍結時,植氷方法에 따른 FAD test의 score는 Co-S(구리선 감은 것) 3.6, N-S(植氷하지 아니한 것) 3.6, P-S(pincette植氷) 3.3 그리고 LN₂-S(LN₂ gas植氷) 3.0 順位였다(P<0.05). >

2. 凍結液에 sucrose添加가添加하지 아니한 것보다生存率이 높았으며 가장 좋은 것은 sucrose를添加한 Co-S(3.90)와 N-S(3.8)였다.

3. 結果的으로, sucrose添加시킨耐凍劑에서 LN₂ container에凍結시킬 때 구리선 감은植氷과植氷하지 않은 것이 pincette seeding과 같은成績을 보여 주어植氷하지 않아도 된다는 것을提示하여 주었다.

V. 引用文獻

1. Bui-Kuan-Nguyen, N., Y. Heyman and J.P. Renard. 1984. Direct freezing of cattle embryos after partial dehydration at room temperature. *Theriogenology*, 22:389-400.
2. Chupin, D. and M.M. De Reviers. 1986. Quick freezing of rat embryos. *Theriogenology*, 26:157-166.
3. Elsdon, R.P., Seidel, G.E. Jr., T. Taketa and G.D. Farrand. 1982. Field experiments with frozen-thawed bovine embryos transferred non-surgically. *Theriogenology*, 17: 1-10.
4. Kasai, M., K. Niwa and A. Iritani. 1980. Survival of mouse embryos frozen and thawed rapidly. *J. Reprod. Fert.*, 59:51-56.
5. Krag, K.T., I.M. Koehler and R.W. Wright, Jr. 1985. A method for freezing early murine embryos by plunging directly into liquid nitrogen. *Theriogenology*, 23:199.
6. Krag, K.T., I.M. Koehler and R.W. Wright, Jr. 1985. Trehalose; A non-permeable cryoprotectant for direct freezing of early stage murine embryos. *Theriogenology*, 23:200.
7. Leibo, S.P. and P. Mazur. 1978. Preservation of mammalian embryos by freezing. In: Inidaniel, J.C. Jr. (ed). *Methods in Mammalian Reproduction* Academic Press New York; 179-197.
8. Massip, A., Vander Zwalm, P., Hanzen, C. and F. Ectors. 1982. Fast freezing of cow embryos in French straws with an automatic program. *Theriogenology*, 18; 325-332.
9. Merry, D.A., R.L. Allen, K. Krag and R.W. Wright, Jr. 1983. Sucrose dilution of frozen mouse embryos; Interaction of glycerol and sucrose concentrations. *Theriogenology*, 20:325-332.
10. Miyamoto, H. and T. Ishibashi. 1983. Solid CO₂ Freezing of mouse embryos. *J. Report. Fert.*, 67:107-111.
11. Miyamoto, H., Y. Miyamoto and T. Ishibashi. 1986. The importance of equilibration time to glycerol prior to freezing in the cryopreservation of mouse embryos. *Japan. J. Zootech. Sci.*, 57:250-256.
12. Nieman, H. 1985. Freezing of bovine embryos; effects of a one-step addition or 1.4M glycerol. *Theriogenology*, 23:369-379.
13. Leibo, S.P. 1984. Osmotic responses of bovine embryos in solutions of sucrose, glycerol or glycerol-sucrose. *Cryobiology*, 21:711.
14. Schilling, E., H. Nieman and D. Smidt. 1982. Evaluation of fresh and frozen cattle embryos by fluorescence microscopy. *Cryo-*

- biology, 15:245-248.
15. Szell, A. and J.N. Shelton. 1986a. Sucrose dilution of glycerol from mouse embryos frozen rapidly in liquid nitrogen vapour. *J. Reprod. Fert.*, 76:401-408.
 16. Szell, A. and J.N. shelton. 1986b. Role of equilibration before rapid freezing of mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 78:699-703.
 17. Szell, A. and J.N. Shelton. 1987. Osmotic and cryoprotective effects of glycerol-sucrose solution on Day-3 mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 80:309-316.
 18. Whittingham, D.G., S.P. Leibo and P. Mazur. 1972. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -296°C . *Science*, 178:411-414.
 19. Williams, T.J. and S.E. Johnson. 1985. Quick-freezing of day four mouse embryos. *Theriogenology*, 23:235.
 20. Williams, T.J. and S.E. Johnson. 1986. A method for one-step freezing of mouse embryos. *Theriogenology*, 26:125-133.
 21. 井上忠恕, 吉田光, 金川弘司, 坂尾伸夫, 倉岡泰郎. 1982. 受精卵凍結装置の開発とウシ受精卵への応用. *家畜繁殖誌* 28:150~152.