

受胎率向上のための胚の凍結・融解方法に関する試験

生物工学部 飛田府宣、川野辺章夫¹⁾、佐藤克彦、佐田竜一、零田容子、齋藤光男

¹⁾現 農業大学校

要 約

エチレングリコール(EG)を耐凍剤とする牛胚の直接移植法について、共同試験により最適な凍結・融解方法を検討した(受精卵移植普及定着化事業)。

黒毛和種またはホルスタイン種雌牛から回収したA～Bランクの後期桑実胚～拡張胚盤胞を、各試験区の凍結溶液を用いて凍結した。凍結溶液は、20%子牛血清(CS)または0.4%牛血清アルブミン(BSA)加リン酸緩衝液(PBS)を基礎溶液とし、耐凍剤として1.8M EG または 1.8M EG + 0.1M シュークローズ(Suc)を添加した。凍結胚は、液体窒素からストローを取り出し空気中に6秒または10秒間保持(エアソーイング)してから温湯で融解後、受胎牛に直接移植した。試験1は、基礎溶液に添加する蛋白質成分をCS、耐凍剤をEG または EG + Suc とし、凍結溶液への Suc の添加が受胎率に及ぼす影響を調べた。試験2は、耐凍剤をEG + Suc、蛋白質成分をBSA または CS とし、蛋白質成分の種類が受胎率に及ぼす影響を調べた。試験3は、蛋白質成分をBSA、耐凍剤をEG + Suc、エアソーイング時間を6秒または10秒間として、エアソーイング時間が受胎率に及ぼす影響を調べた。

1 EG と EG+Suc を耐凍剤として凍結した胚を直接移植した結果、受胎率はそれぞれ 50.0%(3/6)と 66.7%(6/9)で、凍結溶液に Suc を添加することにより受胎率が向上する傾向が認められた。

2 基礎溶液に添加する蛋白質成分を CS と BSA とした場合の受胎率は、それぞれ 52.6%(10/19)と 54.5%(12/22)で両区間に有意差はなく、CS をより安定した製品である BSA に代替できると考えられた。

3 融解時のエアソーイング時間を6秒と10秒とした場合の受胎率は、それぞれ 47.4%(9/19)と 50.0%(12/24)で両区間に有意差はなかった。

4 採胚から耐凍剤平衡までの時間が2時間30分未満と2時間30分以上とした場合の受胎率は、それぞれ 65.0%(13/20)と 34.8%(8/23)であり、凍結までの時間が長くなると受胎率が低下する傾向が認められた。

以上のことから、採胚後できるだけ短時間のうちにEG+Sucを耐凍剤としBSAを添加した凍結溶液を用いて凍結を行い、融解時に6秒または10秒のエアソーイングを行うことで安定して高い受胎率が得られることが示された。

目 的

我が国ではエチレングリコール(EG)を耐凍剤として凍結保存された牛胚の直接移植法(ダイレクト法)が広く普及しているが、各地域でさまざまな凍結・融解方法が用いられており¹⁾、どの手法が優れているか明確ではない。そこで平成14～16年度の3年間、埼玉県農林総合研究センター畜産研究所の吉羽ら^{2,3,4)}が中心となって14府県の

共同試験により凍結胚の移植試験を実施し、最適な凍結・融解方法を検討した(受精卵移植普及定着化事業)。今回、共同試験のうち栃木県で実施した試験の成績について分析を行った。

材料と方法

1 供試胚

当场で飼養されているホルスタイン種(のべ9

頭)および県内の農家で飼養されている黒毛和種(のべ14頭)またはホルスタイン種(のべ3頭)から過剰排卵処置・人工授精後7日目(発情日:0日目)に胚を回収した。灌流液は0.4%子牛血清(CS)加リンゲル液を用いた。採取した胚のうち、形態的品質がA~Bランクで、発育ステージが後期桑実期~拡張胚盤胞期のものを20%CS加修正リン酸緩衝液(PBS)で3回洗浄した後に供試した。

2 胚の凍結

凍結溶液は、20%CS加PBSまたは0.4%牛血清アルブミン(BSA)加PBSを基礎溶液とし、耐凍剤として1.8M EGまたは1.8M EG+0.1M シュークローズ(Suc)を添加したものをを用いた。供試胚を室温下で各試験区の凍結溶液を用いてストローに封入し、耐凍剤の平衡を行った。平衡時間は10~15分間とした。凍結はアルコールバス式のプログラムフリーザー(ET-1、富士平工業)を用いた。

-7℃に保持した冷却槽に、胚を封入したストローをセットし、2分後に液体窒素で冷却したピンセットを用いて植氷した。-7℃で計10分間保持した後、毎分0.3℃で-30℃まで冷却してから液体窒素に投入し、移植を実施するまで液体窒素中で保存した。

3 凍結胚の融解

液体窒素からストローを取り出し空气中に一定時間保持(エアソーイング)後、30℃の温湯に20秒浸漬して融解した。エアソーイング時間は6秒または10秒間とした。融解したストローは直ちに移植器にセットし、受胎牛へ移植した。

4 凍結・融解胚の移植

胚を移植する技術者は、県内で日常的に胚移植を実施している者とした。内訳は、獣医師7名、受精卵移植の資格を持つ人工授精師1名および当該職員2名の計10名であった。受胎牛は、県内の農家または当場で飼養されているホルスタイン種未経産牛または経産牛(のべ92頭)、黒毛和種経産牛(のべ4頭)、交雑種未経産牛(3頭)の計

99頭を用いた。移植は、頸管経由法で黄体存在側の子宮角内へ受胎牛1頭につき1個の胚を直接移植した。

5 試験内容

試験1は、基礎溶液に添加する蛋白質成分をCS、耐凍剤をEGまたはEG+Sucとして、凍結溶液へのSucの添加が受胎率に及ぼす影響を調べた。試験2は、蛋白質成分をBSAまたはCS、耐凍剤をEG+Sucとして、蛋白質成分の種類が受胎率に及ぼす影響を調べた。なお、試験1と2の融解時のエアソーイング時間はいずれも6秒間とした。試験3は、蛋白質成分をBSA、耐凍剤をEG+Suc、エアソーイング時間を6秒または10秒間として、エアソーイング時間が受胎率に及ぼす影響を調べた。

結果

試験1

EGとEG+Sucを耐凍剤として凍結した胚の受胎率はそれぞれ50.0%(3/6)と66.7%(6/9)であり、有意差はないもののEGにSucを添加した試験区が高い傾向を示した(表1)。

表1 凍結溶液へのシュークローズ添加が凍結胚移植の受胎率に及ぼす影響

耐凍剤	移植頭数	受胎頭数	受胎率
EG	6	3	50.0%
EG+Suc	9	6	66.7%

EG : 1.8M エチレングリコール

EG+Suc : 1.8M エチレングリコール+0.1M シュークローズ

基礎溶液 : 20%子牛血清加修正リン酸緩衝液

これを凍結前の胚の発育ステージおよび品質別に分けた成績を表2に、採胚から耐凍剤平衡までの時間で分けた成績を表3に示した。例数が少ないこともあり、受胎率に一定の傾向は認められなかった。

表2 凍結前の胚の発育ステージ及び品質と耐凍剤の種類が凍結胚移植の受胎率に及ぼす影響

耐凍剤	発育ステージ	胚の品質	
		Aランク	Bランク
EG	CM	50.0%(1/2)	50.0%(1/2)
	EB	50.0%(1/2)	-
EG+Suc	CM	60.0%(3/5)	100%(2/2)
	EB	0%(0/1)	100%(1/1)

受胎率(受胎頭数/移植頭数)

EG : 1.8M イチンゲリコール

EG+Suc : 1.8M イチンゲリコール+0.1M シュウコース

CM : 後期桑実胚, EB : 初期胚盤胞

基礎溶液 : 20%子牛血清加修正リン酸緩衝液

表5 凍結前の胚の発育ステージ及び品質と基礎溶液に添加する蛋白質成分が凍結胚移植の受胎率に及ぼす影響

基礎溶液	発育ステージ	胚の品質	
		Aランク	Bランク
CS	CM	50.0%(1/2)	50.0%(1/2)
	EB	37.5%(3/8)	75.0%(3/4)
	BL	50.0%(1/2)	-
	ExB	-	100%(1/1)
BSA	CM	40.0%(2/5)	0%(0/2)
	EB	66.7%(4/6)	50.0%(2/4)
	BL	80.0%(4/5)	-

受胎率(受胎頭数/移植頭数)

CS : 20%子牛血清加修正リン酸緩衝液

BSA : 0.4%牛血清アルブミン加修正リン酸緩衝液

CM : 後期桑実胚, EB : 初期胚盤胞, BL : 胚盤胞

耐凍剤 : 1.8M イチンゲリコール+0.1M シュウコース

表3 採胚から耐凍剤平衡までの時間と耐凍剤の種類が凍結胚移植の受胎率に及ぼす影響

耐凍剤平衡までの時間	耐凍剤	
	EG	EG+Suc
1時間以上2時間未満	-	60.0%(3/5)
2時間以上	50.0%(3/6)	75.0%(3/4)

受胎率(受胎頭数/移植頭数)

EG : 1.8M イチンゲリコール

EG+Suc : 1.8M イチンゲリコール+0.1M シュウコース

基礎溶液 : 20%子牛血清加修正リン酸緩衝液

また、同じ成績を採胚から耐凍剤平衡までの時間で分けた場合は、一定の傾向は認められなかった(表6)。

表6 採胚から耐凍剤平衡までの時間と基礎溶液に添加する蛋白質成分が凍結胚移植の受胎率に及ぼす影響

耐凍剤平衡までの時間	基礎溶液	
	CS	BSA
1時間以上2時間未満	-	100%(2/2)
2時間以上	52.6%(10/19)	50.0%(10/20)

受胎率(受胎頭数/移植頭数)

CS : 20%子牛血清加修正リン酸緩衝液

BSA : 0.4%牛血清アルブミン加修正リン酸緩衝液

耐凍剤 : 1.8M イチンゲリコール+0.1M シュウコース

試験2

基礎溶液に添加する蛋白質成分をCSとBSAとした場合の受胎率は、それぞれ 52.6%(10/19)と 54.5%(12/22)であり、両区間に有意差は認められなかった(表4)。

表4 基礎溶液に添加する蛋白質成分が凍結胚移植の受胎率に及ぼす影響

基礎溶液	移植頭数	受胎頭数	受胎率
CS	19	10	52.6%
BSA	22	12	54.5%

CS : 20%子牛血清加修正リン酸緩衝液

BSA : 0.4%牛血清アルブミン加修正リン酸緩衝液

耐凍剤 : 1.8M イチンゲリコール+0.1M シュウコース

これを凍結前の胚の発育ステージおよび品質別に分けた成績を表5に示した。A ランク胚を、BSA を添加した凍結溶液で凍結した場合の発育ステージ別受胎率は、後期桑実胚、初期胚盤胞および胚盤胞でそれぞれ 40.0%(2/5)、66.7%(4/6)および80.0%(4/5)であり、発育ステージが進むにつれて受胎率が高くなる傾向を示した。

試験3

融解時のエアソーイング時間を6秒と10秒とした場合の受胎率は、それぞれ 47.4%(9/19)と 50.0%(12/24)で両区間に有意差は認められなかった(表7)。

表7 融解時のエアソーイング時間が凍結胚移植の受胎率に及ぼす影響

エアソーイング時間	移植頭数	受胎頭数	受胎率
6秒	19	9	47.4%
10秒	24	12	50.0%

耐凍剤 : 1.8M イチンゲリコール+0.1M シュウコース

基礎溶液 : 0.4%牛血清アルブミン加修正リン酸緩衝液

これを凍結前の胚の発育ステージおよび品質別に分けた場合、一定の傾向は認められなかった(表8)。

表8 凍結前の胚の発育ステージ及び品質と融解時のエアソーイング時間が凍結胚移植の受胎率に及ぼす影響

エアソーイング時間	発育ステージ	胚の品質	
		Aランク	Bランク
6秒	CM	22.2%(2/9)	75.0%(3/4)
	EB	100%(2/2)	33.3%(1/3)
	ExB	100%(1/1)	-
10秒	CM	62.5%(5/8)	28.6%(2/7)
	EB	66.7%(2/3)	50.0%(2/4)
	BL	50.0%(1/2)	-

受胎率(受胎頭数/移植頭数)

CM: 後期桑実胚, EB: 初期胚盤胞, BL: 胚盤胞, ExB: 拡張胚盤胞

耐凍剤: 1.8M イソペンタノール+0.1M シュクロース

基礎溶液: 0.4%牛血清アルブミン加修正リン酸緩衝液

また、同じ成績を採胚から耐凍剤平衡までの時間で分けた場合、6秒区では平衡までの時間が長くなるに従って受胎率が低下する傾向が認められた(表9)。これを平衡までの時間が2.5時間未満と2.5時間以上で分けると、両試験区の合計の成績では受胎率はそれぞれ65.0%(13/20)と34.8%(8/23)であり、2.5時間以上の受胎率が低い傾向が認められた。

表9 採胚から耐凍剤平衡までの時間と融解時のエアソーイング時間が凍結胚移植の受胎率に及ぼす影響

耐凍剤平衡までの時間	エアソーイング時間	
	6秒	10秒
1時間以上1.5時間未満	100%(1/1)	62.5%(5/8)
1.5時間以上2時間未満	66.7%(4/6)	50.0%(2/4)
2時間以上2.5時間未満	100%(1/1)	-
2.5時間以上3時間未満	33.3%(2/6)	44.4%(4/9)
3時間以上3.5時間未満	33.3%(1/3)	50.0%(1/2)
3.5時間以上4時間未満	0%(0/2)	0%(0/1)

受胎率(受胎頭数/移植頭数)

耐凍剤: 1.8M イソペンタノール+0.1M シュクロース

基礎溶液: 0.4%牛血清アルブミン加修正リン酸緩衝液

考 察

我が国の牛胚移植(ET)の実施状況の特徴の一つとして、凍結胚の利用率が高いことが挙げられる¹⁾。これは、他のETの実施頭数の多い諸外国に比べ、農家の飼養規模が小さく、一度に用意できる受胎牛の数が少ないためとされているが、1995年の調査では移植頭数の約79%が凍結胚であり¹⁾、まさに凍結胚移植の受胎率が生産効率の鍵を握っているといっても良い状況である。

胚の凍結・融解方法のなかでも、EGを用いたダイレクト法は、利用の簡便性から我が国の主流となりつつあり¹⁾、当场においても平成4年度から試

験を開始し⁵⁾、現在、体内受精のintact胚についてはほぼすべてEGを用いたダイレクト法で凍結・融解している。EGを用いたダイレクト法は、当初、高い受胎率が報告されていたが⁶⁾、近年、各地域で普及するにつれ、受胎率のばらつきが問題となってきた⁷⁾。胚移植の受胎率に影響を及ぼす要因は、大きく分けて胚に関する要因、受胎牛に関する要因および移植技術者に関する要因があるといわれ⁸⁾、必ずしも凍結・融解方法が受胎率のばらつきの主要因であると断定はできないものの、各地域で受胎率向上対策としてさまざまな凍結・融解方法の修正が試みられてきた。なかでもEGにトレハロース^{9,10)}やシュクロース^{11,12)}といった糖類を添加して高い受胎率を得たとする報告が数多く知られているが、EGおよび糖類の濃度はさまざまなバリエーションがあり¹³⁾、最適な方法に統一する必要性も指摘されていた¹⁾。今回、EGを用いたダイレクト法の凍結・融解方法の検討について、受精卵移植普及定着化事業による3カ年の共同試験が完了し、参加府県全体^{2,3,4)}または各県毎の成績^{14,16)}も報告され始めた。従って、栃木県の成績と参加府県全体の成績の比較も含めて考察したい。

試験1では、移植例数が少ないため断定することはできないが、1.8MのEGを含む凍結溶液に0.1MのSucを添加することにより受胎率が向上する傾向が認められた。共同試験の全体成績は、EGとEG+Sucを用いて凍結した胚の受胎率はそれぞれ43.9%(116/264)と48.7%(132/271)で²⁾、当场の成績と同様の傾向を示した。これは、糖類の細胞膜保護効果¹⁶⁾により、胚の発育ステージや品質等の各種要因による受胎率への影響が緩和されたものと考えられた。

試験2は、基礎溶液に添加する蛋白質成分として、一般的に用いられているCSをBSAに代替した場合の受胎率への影響を確認する試験であった。CSはロットにより胚の発育支持能が異なること

が知られており¹⁷⁾、凍結胚移植の受胎率への影響が懸念されていた。一方、グリセリンを用いて凍結した胚を、ステップワイズ法により融解・移植した西貝ら¹⁸⁾は基礎溶液にBSAを用いており、安定して高い受胎率を報告している。今回の試験により、EG+Sucを耐凍剤とした場合、BSAを用いても受胎率は低下しないことが示された。共同試験全体の受胎率についても、CS区とBSA区でそれぞれ52.8%(132/250)と51.1%(137/268)で両区間に有意差は認められなかった³⁾。従って、CSをより安定した製品と考えられるBSAに代替することに問題はないと考えられた。

なお、試験2において、Aランク胚を、BSAを添加した凍結溶液で凍結した場合、発育ステージが進むにつれて受胎率が高くなる傾向が認められた。西貝ら¹⁸⁾は、発情後7日目の受胎牛に凍結胚をステップワイズ法で融解・移植した場合、受胎率は融解後の移植胚の発育ステージが若いほど低いことを報告しており、凍結・融解した後期桑実胚は受胎牛の子宮環境との日齢差を取り戻すために急速に発育し、結果的に一部の胚が変性するのが受胎率低下の一因ではないかとしている。今後、凍結胚移植の際は胚の発育ステージと受胎牛の発情後日数を考慮し、胚と受胎牛の子宮の日齢差をできるだけ小さくする配慮が必要であると考えられた。

試験3で着目した融解時のエアソーイングは、液体窒素(-196℃)中でガラス化状態にある胚の細胞を加温する際、ガラス転移温度(-130℃付近)をゆっくりと通過させることにより、胚の生存性に悪影響を及ぼすフラクチャー傷害の発生率を低下させる効果をねらったものである¹⁹⁾。しかし、長すぎるエアソーイングは脱ガラス化が起こる温度域(-80℃~-50℃)をゆっくりと通過させることになり、胚の細胞に致命的なダメージを与える危険性がある¹⁹⁾。グリセリンを耐凍剤として凍結した体外受精胚を用いた試験では、エアソーイング時

間を0秒または5秒とした場合は、10秒または15秒とした場合に比べ、フラクチャーの発生率は有意に高かったという報告がある²⁰⁾。一方、EGを用いたダイレクト法におけるエアソーイング時間は5秒から10秒と報告によりまちまちで^{7,8,10,12)}、今回の凍結方法に適した時間を確認する必要があった。その結果、エアソーイング時間を6秒と10秒とした場合の受胎率に有意差は認められず、EG+Sucを耐凍剤とし、基礎溶液に添加する蛋白質成分をBSAとした場合においてはどちらでも可能であることが示された。共同試験全体の成績においても、受胎率は6秒区と10秒区でそれぞれ51.0%(129/253)と52.3%(134/256)で両区間に有意差は認められず⁴⁾、今回の結果を支持した。

また、試験3においては、採胚から耐凍剤平衡までの時間が長くなるに従って受胎率が低下する傾向が認められ、特に2時間30分を超えると受胎率は30%台まで低下した。また、共同試験全体の成績において、受胎率の低下の傾向は灌流液を生理食塩水またはリンゲル液とした場合顕著であることが示された⁴⁾。当场においては採胚と胚の凍結保存を同一の施設内で行っており、比較的短時間内に凍結処理が開始できるため問題は少ないと考えられるが、野外における採胚では採胚から凍結までに時間のかかるケースがあり注意が必要である。リンゲル液を利用した灌流液は、PBSをベースとしたもの等に比較して、きわめて安価で調製が容易であるというメリットがあるが、今後、灌流液の種類が凍結胚移植の受胎率に及ぼす影響を詳しく調査する必要がある。

以上のことから、牛凍結胚のダイレクト法は、採胚後できるだけ短時間のうちに1.8M EG + 0.1M Sucを耐凍剤としBSAを添加した凍結溶液を用いて凍結を行い、融解時に6秒または10秒のエアソーイングを行うことで安定して高い受胎率が得られることが示された。

参考文献

- 1) 下平乙夫. (1997) 国内外における家畜胚の流通の現状 : 日本胚移植学雑誌 19, 34-37
- 2) 吉羽宣明ら. (2004) 凍結媒液に添加するショ糖及びタンパク成分がウシ凍結・融解胚直接移植の受胎率に及ぼす影響 : 第 103 回日本畜産学会大会講演要旨 107
- 3) 福成和博ら. (2005) エチレングリコールとシュークロースを用いて凍結した牛胚の受胎率に影響する要因: 第 20 回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会講演要旨 21, 36-37
- 4) 吉羽宣明ら. (2006) ウシ凍結胚のダイレクト移植による受胎率に影響をおよぼす要因 : 第 21 回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会講演要旨 22, 36-37
- 5) 久利生正邦ら. (1993) 2種類のダイレクト法による牛胚移植の検討 : 栃木酪試研報 117, 7-11
- 6) 堂地修ら. (1991) Ethylene glycol を用いて凍結したウシ胚の Direct Transfer 法による移植 : 第 84 回日本畜産学会大会講演要旨 61
- 7) 木下政健ら. (1999) エチレングリコールとトレハロースを用いて凍結した牛体内由来胚のダイレクト移植(第1報) : 愛媛畜試研報 17, 53-55
- 8) 吉羽宣明ら. (1994) エチレングリコールおよびプロピレングリコールを用いて凍結保存した牛受精卵の直接移植 : 埼畜試研報 32, 9-15
- 9) 大久津昌治ら. (1995) エチレングリコールとトレハロースを用いて凍結したウシ体外受精胚のノンステップ法移植 : 日本胚移植学雑誌 17, 177-182
- 10) 須崎哲也ら. (1996) エチレングリコールとトレハロースを用いて凍結した牛胚の直接移植 : 宮崎県畜産試験場試験研究報告 9, 64-68
- 11) 齋藤美央ら. (1996) シュークロースおよびトレハロースの添加がウシ体外受精胚およびウシ未成熟卵子の凍結融解後の生存性に与える影響 : 静畜研究報 22, 60-63
- 12) 柿野淳ら. (1996) 牛受精卵移植技術の簡易化に関する試験(第4報) : 秋田畜試研報 11, 37-38
- 13) 堂地修ら. (1999) ウシ凍結胚の直接移植法 : 日本胚移植学雑誌 21, 28-34
- 14) 宮城信司ら. (2003) 受胎率向上のための受精卵の凍結・融解方法の検討 - 凍結溶液の違いが受胎率に及ぼす影響 - : 京都淀高総牧試研報 19-21
- 15) 大下雄三ら. (2004) ウシ胚の受胎率向上のための凍結・融解・移植方法の検討 : 鳥取畜試研報 32, 1-4
- 16) 齋藤美央ら. (1998) 牛胚凍結保存液に用いる添加剤の細胞膜保護効果の推定 : 静畜研究報 24, 5-8
- 17) 平泉真吾ら. (1990) 体外受精卵作出技術の確立 - 成熟用培地および発生用培地へ添加された血清の種類が体外受精後の卵子の発生率に及ぼす影響 : 青森畜試報 15, 21-23
- 18) Nishigai M. et al. (1999) The influence of developmental stage and morphological quality of frozen-thawed bovine embryos on pregnancy rate in bovine embryo transfer : J Reprod Dev 45, 301-306

- 19) 葛西孫三郎. (2001) 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 23, 12-17
- 20) 浜野晴三ら. (2001) 牛胚の保存と利用について : 日本胚移植学雑誌 23, 27-31

A study of freezing and thawing method of bovine embryos for pregnancy rate improvement

Abstract

The purpose of this study is to improve the pregnancy rates of the direct transfer method of bovine embryos. Embryos which were collected from Japanese Black beef cows and Holstein dairy cows were cryopreserved in the freezing solution containing 1.8M ethylene glycol (EG) or 1.8M EG+0.1M sucrose(SUC) as a cryoprotectant. A basic medium of the freezing solution were phosphate-buffered saline(PBS) supplemented with 20% calf serum or 0.4% bovine serum albumin. The frozen embryos were thawed by placing the straws in air for 6 sec or 10 sec and then immersing them in 30 ° C water, and transferred into the uterine horn of recipients directly. In the first experiment, the influence of SUC addition to the cryoprotectant solution on pregnancy rates were examined. The pregnancy rates of embryos frozen in EG and EG+SUC were 50.0%(3/6) and 66.7%(6/9), respectively. In the second experiment, the influence of the kind of protein added to the cryoprotectant solution on pregnancy rates were examined. The pregnancy rates of embryos frozen in the cryoprotectant solution containing CS and BSA were 52.6%(10/19) and 54.5%(12/22), respectively. There was no significant difference between the pregnancy rate of CS and that of BSA. In the third experiment, the influence of the time length of thawing of frozen embryos in air on pregnancy rates were examined. The pregnancy rates of the time length of thawing of frozen embryos in air at 6 sec and 10 sec were 47.4%(9/19) and 50.0%(12/24), respectively. There was no significant difference between the pregnancy rate of 6 sec and that of 10 sec. In the same experiment, the pregnancy rates of the time from embryos collection to cryoprotectant equilibration was < 2.5h and 2.5h were 65.0% (13/20)and 34.8(13/20)%, respectively. If time until freezing became long, the tendency to which the pregnancy rate decreased was admitted. These results indicated that the following cryopreservation method brings a high pregnancy rate in frozen-thawed embryos; collected embryos equilibrate within less than 2.5 hours using the cryoprotectant solution of 1.8M EG+0.1M SUC in PBS supplemented with 0.4% bovine serum, and thaw the frozen embryos in air for 6 or 10 sec.