

サル類精子の特性と凍結保存 Characterization and cryopreservation of spermatozoa from monkeys

山海 直¹⁾、広瀬良宏¹⁾、岡田浩典^{1, 2)}、
土屋英明^{1, 3)}、越後貫成美^{1, 4)}、岡田詔子⁵⁾
Tadashi Sankai¹⁾, Yoshihiro Hirose¹⁾, Hironori Okada^{1,2)},
Hideaki Tsuchiya^{1,3)}, Narumi Ogonuki^{1,4)}, Akiko Okada⁵⁾

¹⁾ 国立感染症研究所・筑波医学実験用霊長類センター、
305-0843 茨城県つくば市八幡台 1

²⁾ 東京農業大学生物産業学部

³⁾ 国立水俣病総合研究センター

⁴⁾ 理化学研究所筑波研究所バイオリソースセンター

⁵⁾ 東邦大学医学部

¹⁾ Tsukuba Primate Center for Medical Science, National Institute
of Infectious Diseases, Hachimandai-1, Tsukuba, Ibaraki,
305-0843, Japan

²⁾ Faculty of Bioindustry, Tokyo University of Agriculture,

³⁾ National Institute for Minamata Disease,

⁴⁾ Bioresource Engineering Division, Bioresource Center,
RIKEN Tsukuba Institute,

⁵⁾ Department of Anatomy, Toho University School of Medicine

We have been studied cryopreservation of cynomolgus monkey spermatozoa. The best sperm survival rate was obtained after freezing spermatozoa in a semen-diluting medium (TTE: Tes, Tris, egg yolk base) containing 5% glycerol with 30 minutes equilibrium time. We have revealed that in cryopreserved spermatozoa, beginnings of the process of acrosome reaction before incubation using of zona pellucida penetration assay, execute of in vitro fertilization, and observation of TEM.

Key Words: カニクイザル、精子、凍結保存、先体反応、受精能獲得

1, はじめに

発生工学的研究の目的は、動物の生産性、抗病性の向上、ヒトの疾患モデルとなる新しい実験動物の作出など広範におよぶ。さらに、このような目的で開発さ

れた新しい技術は、絶滅に貧している希少動物の保護、あるいはヒト不妊症の治療法として広く応用できる可能性を持っている。これらの研究はマウス、ハムスターなどの小型実験動物を用いて急速に

発展してきた。家畜においてもその技術開発は精力的に取り組まれている。またヒトにおいてはこれらの技術開発が進み、不妊症治療の一手段として実用段階にある。

我々は、サル類の発生工学的基盤技術の開発と受精、発生機序の解明を目的とし、主としてカニクイザルを実験対象として研究を進めている。これまでに体外受精、顕微授精、胚移植などの技術を確立してきたが、その技術開発の過程でいくつかの基礎となる知見を得ている。本稿では、サル類の精子に注目し、その特性と凍結保存について報告する。

2, サル類の発生工学的研究の現状¹⁻⁴⁾

サル類はヒトに最も近縁な動物であり、ヒトの感染症研究にきわめて重要な動物種である。さらに、生殖、内分泌、代謝、あるいは神経系など、ヒトに類似しているところが多く種々の研究分野においてゆるぎない位置をしめている。また寿命が長く加齢性疾患のモデルとしてもその有用性が期待されている。こうしたサル類研究資源の維持、増殖、保存システムを確立することはきわめて重要な課題であり、それを実現するためには発生工学的手法を用いた基盤技術の開発が必須である。近年、医学研究への適用を目的としてサル類への遺伝子導入、ES細胞の樹立など画期的な成果が報告されている。また、体細胞クローンサル作出なども試みられているが、未だ産児は得られていない。

サル類においては、小型実験動物、家畜あるいはヒトと比較して基礎的データの蓄積が十分ではない。他の動物種で得られたデータを基盤として、試行錯誤を繰り返しながら適用していくことが多い。多少、時間はかかるがより多くのサル類の基礎的データを蓄積して基盤技術を確立していくことが今後の展開を大きく左右するものと思われる。

3, サル類の精子はここが違う⁴⁻⁶⁾

サル類の精液は直腸電気刺激法により採取することが多い。射出後の精液はすぐに凝固してしまう。より多くの活性良好な精子を得るためにはこの凝固を防ぐための工夫が必要となる。精液の凝固は、我々が経験したサル種のなかではとくにミドリザルで顕著に認められ、通常の液化操作を施しても凝固物から精子が浮遊してくることはほとんどない。

採取直後の精子は活発な運動性を持っているが、たとえ卵と出会ったとしても受精はしない。体内では射精後、メス生殖道を移動し卵に進入していく過程で、精子は生理学的、生化学的変化を生じて受精能を獲得していく。体外で精子を使用するときには、その性状を十分に把握していなければならない。サル類精子の体外培養系での特徴の一つとして、hyperactivationを誘起するためにカフェイン、dBc-AMPの添加が必須であるということがあげられる。このことはアカゲザル精子を用いた研究で報告され、我々はカニクイザル、ニホンザル、アフリカミドリザルにおいても同様の結果を得ている。このhyperactivationを誘起するためにはカニクイザルでは6-8時間の培養が必要であり、培養後の精子を用いた体外受精実験により受精が確認されている。ところが、アフリカミドリザルではカニクイザルの場合よりも短い時間でhyperactivationが誘起され、4-6時間の培養精子で体外受精に成功している。精子性状が動物種によって異なっていることは周知のとおりであるが、このように、サル類のなかでも種によって、あるいは体外環境の条件によって得られる成績が異なってくる。

これらの特性はサル類精子に限ったことではないかも知れない。しかし、少なくとも我々の経験しているこの2点については十分に把握しておかなければ凍結融解技術を習得してもその精子を有効に

利用できない可能性がある。

4, カニクイザル精子を凍結する 4-1, 精液採取とその処理^{4, 7, 8)}

サル類の精子採取には、射出精子を採取する方法と精巣上体尾部から精子を採取する方法がある。射出精子の採取法には、交配後の膣から回収する方法、人工膣法、用手法、電気刺激法などが知られているが、供試するサル種および研究目的を考慮したうえで採取法を選択すべきである。我々はカニクイザル精子の採取のために直腸電気刺激法すなわち勃起中枢および射精中枢を刺激することで採取する方法を採用している。本法は、実験者の慣れと供試するサルに対し多少の訓練は必要であるが、ほとんどのオスから精液が採取できる可能性をもった方法である。得られる精液量は微量であり、また得られた精液はすぐに凝固してしまうため、射出後ただちに培地で希釈する。その希釈された精液は70-90%のパーコールで遠心洗浄することで高濃度の活性良好な精子を得ることができる。この操作により精漿成分が除去され精子が濃縮されるものと思われる。精巣上体から精子を採取するときには、尾部のみを分離し培地中で細切して浮遊した精子を回収する。浮遊精子は、射出精子の場合と同じようにパーコールで濃縮洗浄することにより多量の活性良好な精子を回収することができる。精巣上体の摘出から精子採取までの時間は短いほど活性良好な精子が回収できるが、我々はミネラルオイル中に精巣上体を浸し、5℃で24時間保存したのちに活性良好な精子を回収することにも成功している。また、Rotering-cutting バイオプシーニードルを開発し、精巣内精子を含む精細胞の採取を可能にした。

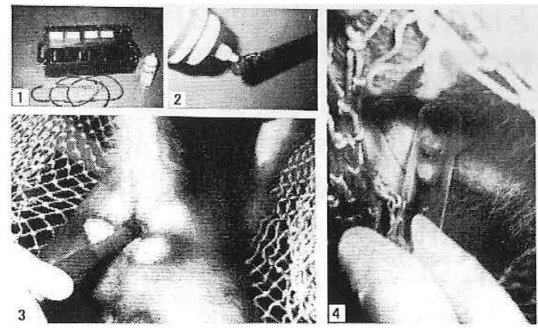


図 1. カニクイザルより直腸電気刺激法により精液を採取しているところ。1) 電気採精器、2) 直腸プローブにゼリーをぬっているところ、3) 直腸プローブをそう入し電圧を上げていく、4) ペニスより出てくる精液をチューブで採取する。

4-2, 凍結と保存^{9, 10)}

数種のサル類精子で凍結保存の成功例が報告されている。しかし、それぞれの方法に特性があり、確立された方法はないものと思われる。我々は、カニクイザル精子の凍結のためにTTE溶液(Tes、Tris、Egg yolkを基本組成としたもの)を開発し、凍結条件を詳細に検討した。その結果、TTE希釈液と耐凍剤としてのグリセリンを組み合わせることにより、凍結融解後、活性良好な精子を回収することに成功している。まず、精液採取後、パーコール洗浄により濃縮された精子を量を測定しながらチューブに移す。ゆっくりと攪拌しながら少しずつTTE溶液を加えていき最終的には10倍に希釈する。この操作は室温で3-5分の間に行う。希釈後、精子の活性が衰えていないことを確認する。チューブに入った精液希釈液を1.5-2時間かけて5℃まで下げる。この間に10%グリセリンの入ったTTE溶液(TTE-G溶液)を調整し5℃にしておく。5℃になったところでTTE-G溶液を加えていくがこの時点でも活性はほとんど衰えていないことを確認する。TTE-G溶液は約30分かけて攪拌しながら、かつ5℃を保ちながら徐々に希釈する。最終的には2倍に希釈し、グリセリン濃度は5%になるようにする。希釈後の活性はグリセリンが入っているため尾部の振幅がゆっくりにはなるが、その段階で死滅する

サル精子の凍結保存

ことはない。ここまでの2段階希釈が終われば直ちに精子希釈液をストローに充填する。やはり5℃を保つよう注意して行う。精子の入ったストローを液体窒素のうへ5 cmの気層に約5分間静置する。我々は液体窒素の上に厚さ5 cmの発砲スチロールを浮かせその上にストローを置くという工夫をしている。気層でストローが完全に凍結したことを確認したら可能な限り温度が上がらないように注意しながら素早く液体窒素中にストローを沈める。液体窒素に沈めた状態で長期保存が可能になる。

表1 カニクイザル精子凍結用希釈液 (TTE溶液) の組成

組 成	用 量 (g/l)
Tes ^a	12
Tris-HCl ^b	2
Glucose ^a	20
Lactose ^c	20
Laffinose ^c	2
Egg yolk	200 (ml)
Penicillin-G	100,000 (IU)
Streptomycin sulfate	50 (mg)

pH:7.0-7.2 Osmolality: 332 mOsmol Water: Milli-Q

^aWako, Osaka, Japan

^bSigma, St Louis, MO USA

^cDifco Laboratories, Michigan, USA

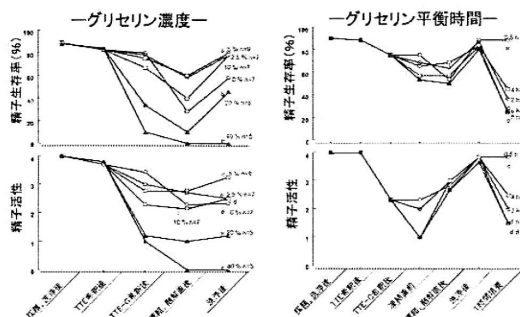


図2. 耐凍剤としてのグリセリン濃度とグリセリン平衡の時間を検討した結果。グリセリン濃度は最終5%、また平衡時間は最も近い30分で良好な精子生存率、精子活性を認めた。

4-3. 融解と融解精子の処理^{9, 10)}

凍結精子の融解処理は、活性良好な精子を得るための重要な操作過程の一つである。ストローを37-38℃のお湯に入れて急速に融解する。直ちに、まわりの水分を拭き取ってストローから融解精子をチューブに取り出す。70-90%パーコールを用いて遠心洗浄する。チューブの底から活性良好な精子が回収される。パーコールで洗浄することで、死滅精子とともに

に凍結時に用いたグリセリンも除去されるものと考えられる。回収された精子は使用目的に応じて処理する。

5. 凍結融解精子の性状を解析する

5-1. 強塩溶液に保存された卵透明帯への進入試験⁹⁾

強塩溶液に保存した透明帯は、受精能を獲得した精子のみの進入を許すことが知られている。本実験の結果、融解直後から培養2時間目の凍結融解精子で透明帯への進入を認めた。非凍結の場合、2時間の培養精子で透明帯進入は認められなかった。すなわち、凍結融解が精子の受精能獲得現象を促進したという結果を得た。

表2 強塩溶液に保存した卵透明帯への凍結融解カニクイザル精子の侵入

供試精子 ^a	前培養時間	培養液 ^b	供試卵数	精子侵入を認めた卵数 ^c (%)
非凍結	2	A	10	0 (0)
		B	17	5 (29.4)
		A	6	0 (0)
	4	B	9	9 (100)
		A	9	0 (0)
		B	11	11 (100)
凍結融解	2	A	9	0 (0)
		B	18	15 (83.3)
		A	6	0 (0)
	8 ^d	B	17	12 (70.6)
		A	--	--
		B	6	0 (0)

^a 直接電気刺激により得られた射出精子を用いた

^b (A) TYH, (B) 1 mM caffeine, 1 mM dBC-AMPを添加したTYH

^c 卵透明帯への侵入を認めた精子数は各卵あたり10個以内であった

^d 8時間培養後の精子は生存性、活性ともにきわめて数えていた

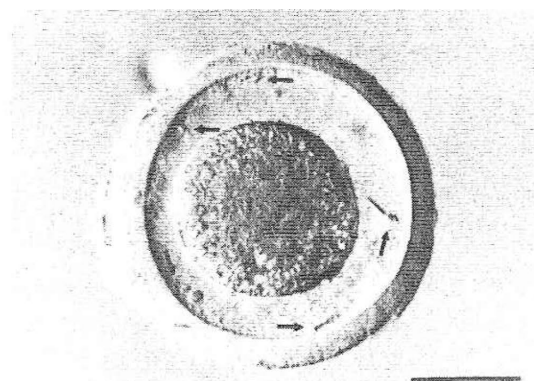


図3. 強塩溶液に保存した卵透明帯に進入したカニクイザル精子 (矢印)。Bar=50μm。

5-2. 人工授精¹⁰⁾

凍結融解により活性良好な精子を得ることができる。凍結融解精子を用いた人工授精により産児を得たという報告がある。しかし、我々の方法で凍結融解精子

を解析した結果（詳細は後述）、これらの精子は運動性を維持している時間が短縮されており、また、先体反応のタイミングが大きくズレている可能性が示唆された。すなわち、メス生殖道を通る過程での精子の変化が重要となる人工授精には少なくとも我々が開発した方法は適していないといえる。

5—3、体外受精および顕微授精^{9, 11-13)}

カニクザルの凍結精子を用いて体外受精を試み受精卵を得ることができた。また、その卵の体外培養により hatched blastocyst への発育を認めた。1994 年、凍結精子を用いた体外受精のはじめての成功例であった。このとき経時間的に凍結融解精子による体外受精を行ったところ、非凍結精子では全く受精が認められない 2 時間の前培養精子で受精が確認された。このことから、我々が開発した方法で凍結融解した精子は、受精能獲得あるいは先体反応様の変化が生じていることが強く示唆された。

また、体外で受精卵を得るための方法として顕微授精が広く試みられるようになってきた。我々は、顕微鏡下でカニクザル精子を直接、卵細胞質に注入することで受精卵を得ており、種々の条件さえ整えれば体外受精よりも高率に受精卵を作出するための技術になり得るものと期待している。また、円形精子細胞の顕微注入卵の移植によりサル類ではじめて妊娠させることに成功している。顕微授精を実施する場合、核の状態が重要であり精子の運動性は問題にならない。一方、より自然に近い状態を *in vitro* で再現すること、あるいは人工授精などを行うためには運動性を維持した精子が必要となる。すなわち研究の目的を明確にしておくことが重要であり凍結保存法も選択されるべきである。いずれにせよ、遺伝資源の保存としては有用であると考えられる。

表3 非凍結および凍結融解カニクザル精子を用いた体外受精

供試精子 ^a	前培養時間	ハイパーアクトベーションの有無	供試卵数	受精卵数 (%)
非凍結	2	--	12	0 (0)
	8	+	17	8 (47.1)
凍結融解	2	+	14	8 (57.1)
	8	--	-- ^b	--

^a 直接電気刺激により得られた射出精子を用いた

^b 8時間培養後の精子は生存性、活性ともに衰えていたため実施できなかった

表4 凍結融解カニクザル精子を用いた体外受精により得られた受精卵の発育培養 一培養240時間目一

供試卵体数	供試卵数	分割卵数 (%)	各ステージまで発育した卵数					
			2-cell	4-cell	8-cell	Morula	Blastocyst	Hatched
5	67	57 (85.1)	4	13	7	20	12	1

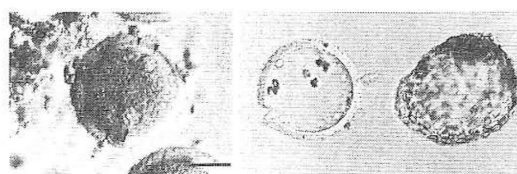


図4 凍結融解精子を用いた体外受精により受精を認めたカニクザル卵。前核期卵（左）と培養により hatch した胚盤胞（右）。Bar=50μm。

5-4、電子顕微鏡による解剖学的解析¹⁴⁻¹⁸⁾

先体膜と先体内容物を含む精子頭部の変化を TEM で観察し、さらに先体の内容物を、FITC-PSA レクチン染色法により共焦点レーザー顕微鏡で観察した。FITC-PSA 染色に際し、生存精子と死滅精子を染め分ける目的で PI (propidium iodide) で核を染色して、凍結融解後にも生存している精子の先体反応について調べた。TEM 固定はタンニン酸を含む固定液を用いて microwave 法で行った。PSA の固定には Cross and Hanks の方法に準じてアルコール固定を行い、その後の洗浄液には PBS を用いた。

回収直後の精子（培養 0 h）の TEM 観察の結果は、精子頭部はほとんど全てが intact であった。2 h 培養後には intact 精子は約半数に低下し細胞膜と外先体膜の融合、外先体膜の陥凹と先体の膨化や先体内に空胞を認める精子が存在した。一方、凍結融解直後（培養 0 h）の精子では、intact 精子が著しく少なく細胞膜と外先体膜の融合や陥凹、先体の膨化や

サル精子の凍結保存

空胞形成した精子が約 70% 存在した。また FITC-PSA による新鮮 0 h 培養の精子はほとんどが intact であった。新鮮 2 h 培養精子では先体の輪郭が不鮮明なものや、先体の一部が染色されないものなどが存在した。FITC-PSA 染色においても凍結融解直後精子における intact 精子は新鮮精子に比べて少なく、先体に何らかの変化を生じていたものが存在した。PI 染色では PI に染まらず FITC-PSA により equatorial segment のみが染色される精子、すなわち生存している精子で先体反応が起きている精子が存在した。

このように凍結融解精子では TEM 観察で膜融合、先体の膨化や先体内の空胞形成が認められたことから明らかに先体反応が進行していることが確かめられた。さらに PSA 染色により生存精子に先体反応完了精子が認められた。凍結による構造の変化は、凍結時の低温処理により Ca^{2+} が増昇し capacitation が誘起されること、さらに先体反応精子と凍結融解精子はアラキドン酸やスフィンゴミエインなどのリン脂質の生化学的変動が類似している事実とも良く一致している。また、凍結融解処理により精子先体反応が促進されることが明らかとなり、この変化は凍結融解精子の受精能保持時間や生存時間が短くなる要因の一つであると推測された。

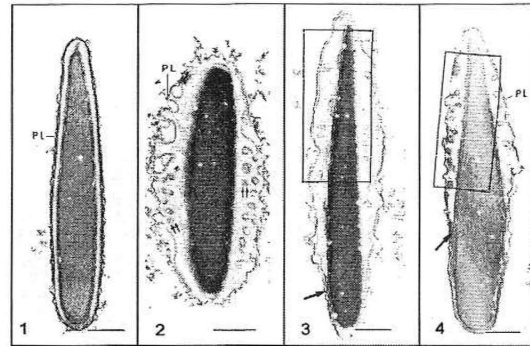


図5 新鮮精子と凍結融解精子の TEM 観察像。1) 非凍結、非培養カニクイザル精子。精子の細胞膜 (PL)、外先体膜と先体の matrix は intact である。2) 非凍結 2 時間培養カニクイザル精子。細胞膜と外先体膜の融合や外先体膜の陥凹と膨化した精子先体の中に明調な空胞と暗調 (矢印) な空胞が認められる。3) 凍結融解後のカニクイザル精子。細胞膜と外先体膜との間に融合部を認める。その他の外先体膜は平坦で細胞膜と平行な部位と凹凸のある部位が観察される。先体は膨化し、その中に沢山の明調な空胞が存在する。赤道節は intact である (矢印)。4) 凍結融解後 2 時間培養したカニクイザル精子。細胞膜と外先体膜 (PL) の融合部位は増加し、膨化した先体内に暗調と明調の空胞が多数存在する。赤道節は intact である (矢印)。Bar=0.5μm。

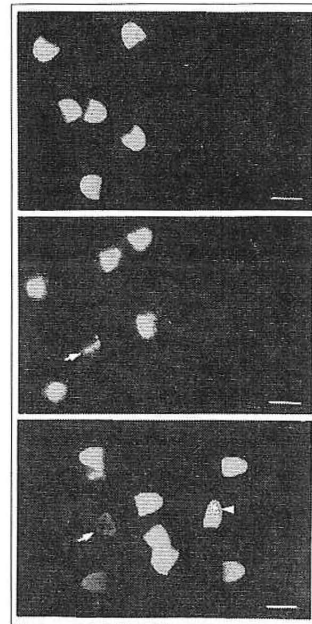


図6 新鮮精子と凍結融解精子の FITC-PSA と PI 染色像。上段は非凍結非培養精子。左半分は FITC-PSA 像、右半分は PI 染色像である。FITC-PSA で尾部は染色されないが頭部先体が染色された intact な精子を認める。右の PI 像は観察されない。6 個の精子は全て生存する intact 精子である。中段は凍結融解直後の精子。左半分は FITC-PSA 像、右半分は PI 染色像である。FITC-PSA 像が intact な精子と irregular な (先体反応過程) 精子が観察される。しかし右の PI 像は観察されていない。矢印の付いた精子の前先体部は FITC-PSA で染色されず赤道節のみが染色されている。この精子は PI で染色されない。生存先体反応完了精子である。下段は凍結融解後 2 時間培養精子。FITC と PI 染色の左右の像を重ねたものである。FITC-PSA では染まり PI で染まらない 6 個の intact 生存精子が観察される。矢じりの付いた精子は intact な FITC 像と精子核の一部が PI で弱く染色された損傷精子である。他に矢印の付いた精子は先体反応中の生存精子である。Bar=0.5μm。

6, サル種による凍結融解精子の性状の比較^{19, 20)}

我々が開発した精子凍結法はカニクイザル精子を用いて確立されたものであるが、全く同じ方法でニホンザル、アフリカミドリザル、アカハラタマリンという他種サル類精子の凍結を試みたところ、カニクイザルと同じマカカ属であるニホンザル精子では同様の成績が得られた。しかし、アフリカミドリザル精子では融解後、活性良好精子はほとんど回収されず、またアカハラタマリン精子では多少の運動性を維持していたもののカニクイザル、ニホンザルのそれと比較するとかなり劣るものであった。この成績は、サル種によって精子の性質、少なくとも耐凍性が異なっていることを示している。何が耐凍能に影響を及ぼしているのか、この解明は容易ではないがサル類精子すべてに共通に使える希釈液を開発するためには必須の課題かもしれない。もっとも、そのブレークスルーによりサル類に限らずすべての動物種に共通の方法を開発することも可能になるかも知れない。

7, おわりに

前述のようにサル類において精子の

表5 サル種による凍結融解精子の性状の比較

サル種	精子活性	生存率 (%)
カニクイザル	+++ (active progressive motility)	80<
ニホンザル	+++ (active progressive motility)	80<
アフリカミドリザル	+ (mostly non-progressive motility)	<30
アカハラタマリン	+++ (active progressive motility)	50-70

凍結保存法などの発生工学的基盤技術を確認することの意義は大きい。しかし、サル類におけるこの種の技術は、研究者によって適宜工夫されているのが現状であり、またサル種ごとに研究を進めていかなければならないことは大きな問題である。本分野の研究は米国を中心として大きく展開しており、多くの研究成果が報告されるようになってきた。着実に基礎データは蓄積されており、今後、すべてのサル種に共通の基盤技術が確立されること、さらにサル類の発生工学的研究が発展していくことを期待したい。

謝辞

本論文を作成するにあたり尾川昭三先生の多大なご高配をいただいたことに感謝いたします。

文献

- 1) Chan, AW, Chong KY, Martionovich C, Simerly C, Schatten G.: Transgenic monkeys produced by retroviral gene transfer into mature oocytes. Science 309-312, 2001.
- 2) Wolf, D. P., Meng, L., Ouhibi, N., and Zelinski-Wooten, M.: Nuclear transfer in the rhesus monkey: practical and basic implications. Biol. Reprod. 60, 199-204. 1999.
- 3) Thomson, J. A., Kalishman, J., Golos, T. G., Durning, M., Harris, C. P., Becker, R. A., and Hearn, J. P.: Isolation of a primate embryonic stem cell line. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 7844-7848. 1995.
- 4) Sankai, T.: In vitro manipulation of nonhuman primate gametes for embryo production and embryo transfer. Exp. Anim. 49, 69-81, 2000.
- 5) Boatman, D. E., and Bavister, B. D.: Stimulation of rhesus monkey sperm capacitation by cyclic nucleotide mediators. J. Reprod. Fertil. 71, 357-366. 1984.

- 6) Balmaceda, J. P., Pool, T. B., Arana J. B., Heitman, T. S., and Asch, R. H.: Successful *in vitro* fertilization and embryo transfer in cynomolgus monkeys. *Fertil. Steril.* 42, 791-795. 1984.
- 7) Lanzendorf, S. E., Gliessman, P. M., Archibong, A. E., Alexander, M., and Wolf, D. P.: Collection and quality of rhesus monkey semen. *Mol. Reprod. Dev.* 25, 61-66. 1990.
- 8) Mahony, M. C., Oehninger, S., Doncel, G., Morshedi, M., Acosta, A., and Hodgen, G. D.: Functional and morphological features of spermatozoa microaspirated from the epididymal regions of cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Biol. Reprod.* 48, 613-620. 1993.
- 9) Sankai, T., Terao, K., Yanagimachi, R., Cho, F., and Yoshikawa Y.: Cryopreservation of spermatozoa from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J. Reprod. Fertil.* 101, 273-278. 1994.
- 10) Tollner, T. L., VandeVoort, C. A., Overstreet, J. W., and Drobnis, E. Z.: Cryopreservation of spermatozoa from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J. Reprod. Fertil.* 90, 347-352. 1990.
- 11) Ogonuki N, Tsuchiya H, Hirose Y, Okada H, Ogura A, Sankai T: Pregnancy by the tubal transfer of embryos developed after injection of round spermatids into oocyte cytoplasm of the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Hum. Reprod.* 18, 1273-1280, 2003.
- 12) Hewitson, L., Dominko, T., Takahashi, D., Martinovich, C., Ramalho-Santos, J., Sutovsky, P., Fanton, J., Jacob, D., Monteith, D., Neuringer, M., Battaglia, D., Simerly, C., and Schatten, G.: Unique checkpoints during the first cell cycle of fertilization after intracytoplasmic sperm injection in rhesus monkeys. *Nature Med.* 5: 431-433. 1999.
- 13) Ogonuki, N., Sankai, T., Cho, F., Sato, K., and Yoshikawa, Y.: Comparison of two methods of assisted fertilization in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*): Intracytoplasmic sperm injection and partial zona dissection followed by insemination. *Hum. Reprod.* 13, 2555-2560. 1998.
- 14) Okada A, Igarashi H, Kuroda M, Terao K, Yoshikawa Y, Sankai T: Cryopreservation-induced acrosome vesiculation in live sperm from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Hum. Reprod.* 16, 2139-2147, 2001.
- 15) Cross NL and Hanks SE.: Effects of cryopreservation on human sperm acrosomes. *Hum. Reprod.* 6, 1279-1283, 1991.
- 16) Zhao Y and Buhr MM.: Cryopreservation extenders affect calcium flux in bovine spermatozoa during a temperature challenge. *J. Androl.*, 16, 278-285, 1995.
- 17) Fuller SJ and Whittingham DG.: Capacitation-like changes occur in mouse spermatozoa cooled to low temperatures. *Mol. Reprod. Dev.* 46, 318-324, 1997.
- 18) Buhr MM., Curtis EF. and Somnapanakuda N.: Composition and behavior of head membrane lipids of fresh and cryopreserved boar sperm. *Cryobiology* 31, 224-238, 1994.
- 19) Sankai, T., Ogonuki, N., Tsuchiya, H., Shimizu, K., Cho, F., and Yoshikawa, Y.: Comparison of results from IVF-related studies for cynomolgus monkeys, Japanese monkeys, African green monkeys, and red-bellied tamarins. *J.Fertil. Imp. (Tokyo)*. 15, 177-179. 1998.
- 20) Sankai, T., Shimizu, K., Cho, F., and Yoshikawa Y.: *In vitro* fertilization of follicular oocytes by frozen-thawed spermatozoa in Japanese monkeys (*Macaca fuscata*) *Lab. Anim. Sci.* 47, 58-62. 1997.