卵の初期発生と着床機構

若 杉 昇

名古屋大学農学部, 名古屋市 464

Development of Mammalian Eggs and Implantation

Noboru WAKASUGI

Faculty of Agriculture, Nagoya University, Nagoya-shi 464

卵子の発見と細胞説

“すべて生物は卵から” これは 17 世紀の解剖学者, WILLIAM HARVEY (1651) の有名な言葉であるが, 哺乳類の卵がこの時代にすでに発見されていた訳ではない. DE GRAAF (1672) は哺乳類の卵巣は鳥類のそれと同じく, 卵子形成の器官であり, 卵胞 (Graafian follicle) は卵そのものか, または卵と相同なものを含有しているとの見解に達したが哺乳類の卵が発見されたのは, それから約 100 年後である. CRUICKSHANK (1797) は交尾後約 3 日のウサギの卵管内において桑実期の卵を発見しその後の発生過程を記述した. 卵胞内の 卵子は VON BAER (1827) によりイヌにおいて発見され, その後, 卵胞, 卵子, 胚の発達などに関する研究が急速に進歩した. この頃, 細胞が生物を構成する基本単位であるという細胞説が SCHLEIDEN (1838) と SCHWANN (1839) によって発表された. これに続いて, KÖLLIKER (1841) は精子が精巣で作られる単一の細胞であることを, GEGENBAUER (1861) は哺乳類の卵は一個の細胞であることを発表した. ここにおいて, 哺乳類の卵は核 (germinal vesicle), 細胞質 (vitellus) および透明層 (zona pellucida) より成る一個の細胞であることが認識された. その後, 卵子の成熟, 受精, 卵割などに関する詳細な観察が行なわれると共に, 体外受精, 受精卵移植などの試みが行なわれた. 受精の際卵子および精子の核が結合することが観察され遺伝現象に関する細胞学的根拠が認識されるに至った. 今日の発生学の基礎は, これらの 19 世紀後半における一連の研究によって築かれたと言えよう.

卵子発生および排卵

胎仔期の生殖隆起 (genital ridge: 生殖腺の原基) に定着した primordial germ cells が卵巣の分化発達と共に分裂増殖し oogonia (卵祖細胞) になる. この生殖細胞の増殖は胎仔期の間続き, 出生時 (または出生後の短期間) において停止する. oogonia はすでに primary oocyte (卵母細胞) に分化しており, 卵巣内には一定数の卵母細胞が貯えられる. この数は非常に大きなものの¹⁾でラットにおいては約 16 万であると報告されている. しかし多くの卵母細胞はその後変性消失するため, 排卵される卵はほんの少数に過ぎない. マウスの W-locus の mutant においては生殖細胞の数が正常のものより少ないことが報告されている²⁾. 出生後の個体の発達と共に卵子発生が進む^{3,4)}. まず卵母細胞が生長し始め成熟卵とはほぼ同じ大きさに達する頃卵母細胞は一層の細胞 (follicle cells) によって取り囲まれ卵胞 (follicle) の形成が始まる. その後 follicle cells の層が次第に増加し卵母細胞の周りに透明層 (zona pellucida) が形成される. 卵胞全体も大きくなり卵胞内に腔所 (卵胞腔: antrum of follicle) が形成され成熟卵胞となり, 卵子は卵丘に位置する. マウスにおいては卵胞が卵胞形成の初期から成熟卵の大きさに達するまでに 16 日間を要する⁵⁾. 卵母細胞の核は germinal vesicle と呼ばれ網状の構造を有し比較的大きな核仁が存在する (dictyate stage). この時期の染色体は魚類, 両生類, 爬虫類, 鳥類の卵母細胞の lampbrush chromosome に相当するが受精後の発生過程に必要な細胞物質の合成が行なわれる

ものと考えられる^{5,6,7,8,9)}。卵母細胞および卵胞が十分に生長すると次に卵母細胞は成熟期に入る。Dictyate stage にあった核 (germinal vesicle) が崩壊し第一成熟分裂 (first meiotic division) に入り tetrads (4N) を構成する。分裂の後期に入りそれが2組の dyads (2N) に分かると1組の dyads は第一極体 (first polar body) として vitellus の外に放出される。この時 vitellus の収縮により zona pellucida と vitelline membrane の間に腔所 (perivitelline space) ができる。第一極体はその後変性消失する。この状態の卵子を卵娘細胞 (secondary oocyte) と呼ぶ。vitellus の中に残った dyads はそのまま第2成熟分裂の中期へ移行して活動を休止する。少数の例外を除く多くの動物種では卵子はこの休止状態にある secondary oocyte として卵立細胞の塊 (cumulus oophorus) に取り囲まれて排卵され卵管に入る¹⁾。以上が卵子発生の概略であるが、卵母細胞の生長は主として FSH により促進され、成熟期への移行は LH によって誘起される^{10,11)}。ラットにおいては第一成熟分裂の開始は LH の放出後すぐに起り約2時間後 (排卵前約9時間) に germinal vesicle が崩壊し、第一極体は排卵の約4時間前に放出される^{12,13)}。以上が自然排卵の過程であるが、ウサギ、イタチなど交尾排卵の動物においては交尾刺激により LH が分泌されて卵子の成熟が始まり排卵が起る。第一成熟分裂の際 germinal vesicle の崩壊が染色体の出現より先に起るかまたはその逆であるかは動物種によって異なると思われる^{13,14)}。また卵巢内の卵子を培養液に取り出すと卵子は LH の作用なしで自然に成熟分裂を開始すること¹⁴⁾より LH は卵子の成熟を促進するというよりは、卵胞細胞に変化を生じさせ卵子が成熟過程に移行するのを抑制している要因を取り除くと同時に排卵を促す作用を有していると思われる。ラットにおける排卵数の決定は発情休止期の中間点付近において行なわれること¹⁵⁾および過排卵処置における排卵数は投与するホルモンの量によること¹⁶⁾などより多排卵動物における排卵数は下垂体より放出される FSH の量によって決定されると考えられる。しかしマウスにおいては雄の存在により発情が促進される現象^{17,18)} (Whitten effect) が知られており、さらに雄の臭い (male pheromone) の作用により排卵数が増加する現象も知られ、male pheromone の合成に関与する遺伝子の存在が認められている¹⁹⁾。卵子発生の過程に関与する遺伝子は mexican axolotl⁵⁾ および *Drosophila*^{20,21,22)} において認められている。

精 子 形 成

精子形成に関しては、OAKBERG²³⁾、OAKBERG²⁴⁾ および ROOSEN-RUNGE²⁵⁾ によって詳細な記載が発表されている。ここでは卵子発生と精子形成における基本的な相異点について述べる。第一は卵子発生においては1個の卵祖細胞から1個の成熟卵子が形成されるのに対し、精子形成においては1個の精祖細胞より4個の精子が形成されることである。卵子には多量の細胞質が貯えられるのに対し、精子に含まれる細胞質要素 (mitochondria, Golgi, centriole) は非常に少ないという形態的特徴を反映しているものと考えられる。第二は oocyte における減数分裂時の2つの X-染色体は isopycnotic である²⁶⁾ が spermatocyte における減数分裂時の X, Y-染色体は heteropycnotic である²⁷⁾。これは雌性決定因子と雄性決定因子の組換えを防止する機構であると考えられている。第三は, oogonia はすべて等価なもので1種類であるのに対し, spermatogonia には2種類 (type A と type B) が存在することである。Type B は精子形成の過程を経て精子に分化していく。Type A からは type B と新たな type A が形成され type B は精子に分化し新しく作られた type A からは再び type A と type B が形成される。この type A と type B の関係は生殖細胞と体細胞の関係に似ている。前述の primordial germ cell に関する研究は余り進められていないが今後の研究により生命現象に関する基本的な知見が得られるのかもしれない。精子形成の異常はマウス^{28,29)}、ラット³⁰⁾、ウシ³¹⁾などにおいて報告されている。マウスの T-locus の遺伝子の作用に関しては引き続き研究が進められている^{32,33)}。

受精および卵割

射精直後の精子は受精能力がなく、子宮内に一定時間滞留した精子は受精能力を有することなどにより、精子が卵子に侵入する能力を有するには何らかの生理的変化を経なければならぬことが発見された^{34,35)}。この現象は受精能獲得 (Capacitation) と呼ばれている。Capacitation の過程は2段階に分けられ、第1段階は精子の plasma membrane に生理的変化が誘起される過程、第2段階は sperm head の先端に位置する acrosome が活性化される過程 (acrosome reaction) である³⁶⁾。Capacitation を誘起する物質は cumulus cells に由来すること^{37,38,39)}、およびその作用を有する物質は血清中にも存在し、排卵時における血清が最も高い活性を示すことが報告されている⁴⁰⁾。acrosome は一種の lysosome

図 1. 細胞期: 受精後第2極体が放出される

図 4. 8細胞期

図 2. 2細胞期

図 5. 桑実期 (位相差顕微鏡観察)

図 3. 4細胞期

図 6. 胚盤胞期 (位相差顕微鏡観察)

マウス卵の初期発生

図 7. 胚盤胞期 (位相差顕微鏡観察)

図 10. 着床初期

図 8. DDK 雌×C 57 BL 雄における
胚盤胞形成異常胚
(位相差顕微鏡観察)

図 11. DDK 雌×KK 雄における異常胚

図 9. 着床前の胚

図 12. DDK 雌×NC 雄における異常胚

マウス卵の初期発生

とみなされ⁴¹⁾、それに含まれる酵素に関しても研究が進められている^{42,43)}。acrosome の活性化は精子が zona pellucida を通過するに必要である³⁷⁾。

受精能を獲得した精子は zona pellucida を通過して vitellus に侵入する^{44,45)}。最初の精子が vitelline membrane を通過すると間もなく zona pellucida に変化が生じ、他の精子はそこを通過できなくなる (zona reaction)。これは多精子受精を防止する機構であると考えられている。さらに vitelline membrane にも変化が生じ、二重に多精子受精を防止する機構が働く。この機構は最初の精子の侵入により vitellus の表面から酵素が放出され zona pellucida に変化が生ずることによるか⁴⁶⁾、または分解酵素の inhibitor が放出されて他の精子を不活性化することによる⁴⁷⁾。Zona reaction の強さは動物種間において相異があり、マウスにおいては系統差の存在することが報告されている⁴⁸⁾。ハムスターの卵においては zona reaction は精子の vitellus への侵入後 15 分以内に完成し、vitelline membrane による多精子受精の防止機構は 2~3.5 時間後に完成する⁴⁹⁾。ウサギの卵では zona reaction ははっきりせず、多数の精子が perivitelline space に侵入する。卵丘細胞が卵子から離散する時期についても動物種に相異があり (受精前~2細胞期)¹⁾、マウスにおいては系統差が認められている⁴⁸⁾。

精子が vitellus に侵入すると卵は活性化され、第二成熟分裂が再開され中期より後期へと進み、dyads を構成していた染色体は 2 組に分れ、1 組は第二極体として放出される (図 1)。卵核の染色体数は haploid (N) になり、前核期 (雌前核: female pronucleus) へ移行する。精子核は膨潤して大きくなり雄前核 (male pronucleus) になる。前核内に仁が発達し、それが細胞質に移行することが観察されている⁵⁰⁾。前核期の終りに雄前核と雌前核は卵の中心に並び、核膜が消失して染色体が出現する。次に両方の染色体が結合 (syngamy) して diploid (2N) になり、第一分割 (first cleavage) の核分裂に入り受精が終る。syngamy の時に雄前核に出現する中心体 (centriole) は受精の際精核と共に持ち込まれたものか、または卵の中で雄前核の影響により新しく形成されたものかははっきりしない⁵¹⁾。マウスにおいては受精後 4 時間で前核の形成が始まり、受精後約 20 時間で第一分割が起り 2細胞期に入る⁵²⁾ (図 2)。ブタにおいても受精約 4 時間後に前核の形成が始まる⁵³⁾。第一分割の後、約 12 時間に 1 回の割合で分割が起り、4細胞期 (図 3)、8細胞期 (図 4)、16細胞期、…桑実期 (morula stage 図 5)、胚盤期 blastocyst stage 図 6,7) へと発生が進行していく。個々の割球 (blastomere) の分裂は同時に

起こるとは限らないため、中間数の割球が観察されることがある。

卵巢より排卵された卵子は、受精、卵丘細胞の離散、卵割の過程を経ながら卵管内を下降し、8細胞期~桑実期に達する頃 (受精後 2~3 日) に子宮内に到達する。ウサギにおいては卵丘細胞の離散直後に卵管から分泌されるアルブミン様の物質が zona pellucida の表面に沈着し始め比較的厚い層 (mucin coat) が形成される。Mucin coat 形成後、卵の直径は約 2 倍になる⁵⁴⁾。マウスにおいては卵割の速度に系統差が認められ、卵割の速度に関与する卵子要因および精子要因の存在が示唆されている⁵⁵⁾。精子の over-capacitation が受精後の発生過程に影響を及ぼすことも認められている^{56,57)}。

卵の細胞質中に存在する核仁由来の RNA (ribosomal RNA) の量は卵子発生の間増加し、排卵および受精時には減少し、8細胞期以後に再び増加する (FLAX: MINTZ⁵⁸⁾ の引用による)。受精後の新たな RNA 合成は 2細胞期において開始されるが^{59,60)}、活発な合成は 4細胞期以後に始まる^{58,61,62,63)}。蛋白質合成は 4細胞期以前に始まっており、卵子発生の過程において合成貯蔵された RNA の重要性が示唆されている⁵⁸⁾。一方、電子顕微鏡観察により、排卵時の卵では小さな ribosome の塊が細胞質全体に散らばって存在していることが示されている⁶⁴⁾。前核期と同様⁶⁰⁾、分割期の割球の核においてもいくつかの核仁が形成されるが、それらのうち一個のみが形態的な変化 (peripheral network) を示す。この形態変化を示す仁は RNA および蛋白質合成に関与しているのであるが、8細胞期以後におけるこれらの仁は adult cells のものとよく似ている⁶⁴⁾。

卵の酸素消費量は卵割の進行と共に徐々に増加していくが、胚盤期形成期に急激に増加する^{65,66,67)}。4~8細胞期以前のマウスの卵においてはエネルギー源として glucose は利用されないが pyruvate は利用される。8細胞期以後においては glucose を利用することができる^{68,69,70)}。卵割期のウサギの卵では pentose-cycle が活発に働いているが、胚盤期形成後には Embden-Meyerhof pathway が活動を始める^{66,71,72)}。これらの代謝機能の変化はそれぞれの発生の stage における酵素活性の変化 (すなわち遺伝子の活動の開始) を示していると考えられる⁷³⁾。一方、組織化学的研究により、排卵時の卵には多量のグリコーゲンが存在し、その蓄積は 2~8細胞期にさらに増加し胚盤期形成期に消費されることが示されている⁷⁴⁾。

卵割期の胚は未分化の一種類の細胞群によって構成されているが、胚盤期には二種類の細胞 (inner cell mass

と trophoblast) が分化する。この分化を誘起する機構がいつ頃から作用を開始するかは興味ある問題である。卵割期の胚を注意深く観察すると、胚の上部の細胞は小型であるのに対し下部の細胞は大型であるとか、また胚の内部に位置する細胞は球形であるのに対し外部の細胞は楕円形であるなどの形態的特徴が認められる。細胞相互の位置関係が分化の鍵であるかもしれない。マウスの2~4細胞期の胚の周辺に位置する細胞質は trophoblast にのみ移行する⁷⁶⁾。8~16細胞期において胚の内部に位置する細胞と外部の細胞との区別が現われるが内部に位置する細胞は8細胞期の8個の割球のうち最初に分割する4個の割球の内の1個より形成され、その後内側の細胞の分裂は外側の細胞の分裂より早く進行する⁷⁶⁾。アルマジロにおいては4細胞期において割球が分離し、独立して発生を続け4個体を生ずるが、それらの個体の遺伝形質は相当に異なっており、4細胞期における細胞質要因に差の生じていることが示唆されている⁷⁷⁾。これらのことより細胞質要因の差により分割の速度に差が生じ細胞(割球)相互の位置関係が規制されていくことが予想される。このように分化の徴候は卵割の初期に認められるが、分化の機構が進行した後であっても胚の細胞は可逆的に自身の分化を調節する作用を有している。すなわち人為的に細胞(割球)の位置関係を変えたとその後の細胞の分化の過程が変化することが認められている。2細胞期以後の異なった胚の割球を組み合わせる実験⁷⁸⁾、8細胞期付近の2つの胚を融合させる実験^{79,80)}などが報告されている。後者の方法により得られたモザイクマウスに関しては多くの興味深い生物学的知見が得られている^{81,82,83,84,85)}。さらに胚盤胞期に進んで trophoblast に分化した細胞も位置関係の変化により inner cell mass の細胞として分化することが示されている^{86,87,88,89)}。

マウスの染色体数は $2n=40$ であるが、X染色体を1本だけもつ個体 ($38+X:XO$) は雌としての機能を有する⁹⁰⁾。この雌においては ($19+X=20$) および ($19+O=19$) なる染色体構成をもった2種類の卵が生じ、受精により、($38+XX$)、($38+XO$)、($38+XY$) および ($38+OY$) の4種類の胚が形成される。第1および第2の胚は雌、第3の胚は雄であるが、第4の胚 (OY) は2細胞期において死亡する⁹¹⁾。T-locus の mutant (t^{13}/t^{13}) は乗実期において死亡する^{92,93)}。

胚盤胞形成と着床

乗実期を過ぎると胚の内部に腔所 (blastocoele) が現れ胚盤胞形成 (blastocyst formation) が開始される。Blastocoele は徐々に大きさを増し、それに伴って胚は

外側に位置する細長い細胞 (trophoblast) と内側の細胞塊 (inner cell mass) によって構成される。その後、内胚葉が形成され blastocoele の内側を裏打ちする。

受精後、卵内に cytoplasmic vesicle が出現し卵割が進むにつれてその数と大きさが増加することが観察され、blastocoele 内の液体はこの cytoplasmic vesicle に由来することが示唆されている⁹⁴⁾。一方、割球間の結びつきは卵割が進むにつれて強くなっていくが、胚盤胞液流出の防除および blastocoele への液体の active transport の機構が出来あがっていくと考えられている⁹⁵⁾。割球間の結合が密接でない場合には割球からの液体の放出は起らない⁹⁶⁾。ウサギにおいては胚盤胞形成を促進する蛋白質 (blastokinin) が交尾後4~9日の子宮内において発見されている⁹⁶⁾。Blastokinin は他の動物の胚盤胞形成を促進させる作用を有する⁹⁷⁾。胚盤胞形成の進行と共に blastocoele が大きくなり胚全体が膨張する。膨張の度合は動物種によって異なり、それに伴って zona pellucida は薄くなっていく⁹⁸⁾。着床の様子も胚盤胞の大きさすなわち動物種によって異なる。小さな胚盤胞は子宮壁内に深く入り込み (interstitial)、大きな胚盤胞は子宮壁の表面に浅く止り (superficial)、それらの中間型もある^{98,99)}。Zona pellucida と胚盤胞との分離に関しては、zona pellucida が破れて胚盤胞が外に出る (hatch)、あるいは子宮液の作用により zona pellucida が溶解する (lysis) という二通りの観察がある^{100,101,102,103)}。モルモットにおいては着床後に zona pellucida が消失する¹⁰⁴⁾。着床の際、子宮壁に付着するのは inner cell mass 側か、または反対側か、は重要なことであるが、胚と子宮との付着が起った後に trophoblast の内側を inner cell mass が移行して自らの方向づけ (orientation) を行なうという説が提唱されている¹⁰⁵⁾。

着床時のマウス胚が図9,10に示されているが、ラットの着床過程においては次のような段階が電子顕微鏡により観察されている¹⁰⁶⁾。Pre-attachment stage: 胚盤胞は浮遊しているか、またはかすかに子宮壁に接触している。Early attachment stage: 子宮上皮細胞より突出した cytoplasmic extrusion および microvilli と trophoblast が付着する。trophoblast cell から小さな突出がみられる。Late attachment stage: trophoblast と上皮細胞の接触部が波状 (interdigitate) になって付着が強固になる。Trophoblast と上皮細胞が junctional complex を形成することも報告されている¹⁰⁷⁾。Invasion stage: 接触部の上皮細胞が消失し trophoblast は他の上皮細胞の間に割って入る。その後子宮壁に脱落膜反応が生ずる。この過程は胚と子宮との密接な相互作用に

よって進行する。子宮壁は *trophoblast* に反応するが *inner cell mass* には反応しない¹⁰⁸⁾。さらに *trophoblast* より *vesicle* が放出されることが観察されているが¹⁰⁹⁾、これは胚の存在を示す情報を運ぶものかもしれない。また、上述の子宮上皮細胞の *cytoplasmic extrusion* は着床時のすべての上皮細胞に形成されることより、これは *vesicle* の情報を受け取る *receptor* の働きを持っているのかもしれない。

排卵後 *progesterone* の作用により子宮において着床の準備が行なわれるが、マウスおよびラットでは着床のために *estrogen* の作用 (*estrogen surge*) が必要である¹¹⁰⁾。さらにこの *estrogen* の作用により子宮細胞より放出された *histamine* が着床を誘起することが示されている¹¹⁰⁾。またこれらの動物においては、後分娩発情という現象がみられ、この時に交尾受精が起ると哺乳中に妊娠が進行するが、哺乳仔が多い場合には子宮内の胚は着床前 (胚盤胞期) において一時的に発生を休止する。その後、子宮内条件の変化に伴って着床が開始される^{111,112,113)}。この現象は着床遅延と呼ばれているが、哺乳中でない雌においても、交尾後に卵巣除去し *progesterone* および *estrogen* を投与することにより人為的に作り出すことができる^{105,114,115,116)}。さらに胚の体外培養においてもこれに類似した状態を作り出すことができる^{117,118)}。マウスにおいては雄の臭いによって妊娠が中止することが知られているが、妊娠の中止は雄の臭いが胚の着床前に作用した場合に限られる (*Bruce effect*)^{119,120,121)}。さきに述べた子宮上皮細胞の *cytoplasmic extrusion* がこれらの着床停止 (中止) 期にみられるかどうかは興味あることと思われる。

以上が卵の初期発生および着床に関する概要であるが、他に、成熟分裂、受精および卵割期に生ずる染色体異常¹²²⁾、胚 (胎仔) と母親の間の免疫学的相互関係など^{123,124)} についても研究が進められている。

DDK マウスの繁殖力について

近交系マウス DDK と他の系統との正逆交配において、他系統雌×DDK 雄の交配は正常な繁殖力を示すのに対し DDK 雌×他系統雄の交配はほとんど不妊であることが発見され¹²⁵⁾、この繁殖力の低下は DDK 雌の子宮内で胚が胚盤胞形成の過程で死亡する (図 8, 11, 12) ことに起因していることが認められた^{126,127)}。胚の死亡の原因として DDK 雌の子宮内環境と胚 (F₁) との不適合性、および、卵の細胞質と精子との不適合性の二つが考えられるが、卵巣移植実験により後者が胚の死亡の原因であることが明らかになった¹²⁷⁾。受精時に始まる不

適合性が胚盤胞期に胚の死亡となって現われるのは不自然に思われるが、さきに述べたように、受精、卵割、胚盤胞形成に必要な準備はすでに卵子発生の過程において進められている。Mexican axolotl の *o*-遺伝子に関する研究においては、この胚形成 (*gastrulation*) に必要な物質が卵子発生の過程において合成貯蔵されることが示されている^{6,6,7)}。DDK の卵には他の系統のものとは異なった細胞質要因が貯えられ、これと他系統の精子要因 (染色体または遺伝子) との不適合性が卵割期に現われ、胚盤胞形成の準備が進行しないため胚は胚盤胞形成の過程で死亡することが予想される。

不適合性の原因となっている DDK の卵子要因および他系統の精子要因についての遺伝学的研究に関する報告は現在作製中であるが、この二つの要因は体染色体性の同一座位に位置する遺伝子によって支配されていることが明らかになり、卵子発生の過程において DDK 遺伝子の作用により合成された細胞質物質と精子の持ち込む遺伝子との間に不適合性が生じ、卵割期において胚盤胞形成の準備が進行しないことにより胚は胚盤胞形成の過程において死亡するとの仮説が提唱されるに至った。マウスの卵は非常に小さいため、細胞質物質を分離比較することは困難であるが、哺乳類において卵子発生の過程に作用を現わす遺伝子が認められた最初の例と言えよう。

文 献

- 1) AUSTIN, C. R., *The Mammalian Egg*. Blackwell Scientific Publications. Oxford. 1961.
- 2) MINTZ, B., *J Cell comp Physiol* 56: 31. 1960.
- 3) PEDERSEN, T., *J Reprod Fert* 21: 81. 1970.
- 4) KENT, J., *J Reprod Fert* 31: 323. 1972.
- 5) BRIGGS, S., and G. CASSENS, *Proc Natl Acad Sci US* 55: 1103. 1966.
- 6) BRIGGS, S., and J. T. JUSTUS, *J Exp Zool* 167: 105. 1968.
- 7) BRIGGS, S., *J Exp Zool* 181: 271. 1972.
- 8) DAVIDSON, H. H., and B. R. HOUGH, *Proc Natl Acad Sci US* 63: 342. 1969.
- 9) BRACHET, J., F. HANOCQ, and P. VON GANSEN, *Devel Biol* 21: 157. 1970.
- 10) RYLE, M., *J Reprod Fert* 30: 395. 1972.
- 11) TSAFRIRI, A., H. R. LINDNER., U. ZAR, and S. A. LAMPRECHT, *J Reprod Fert* 31: 39. 1972.
- 12) TSAFRIRI, A., and P. F. KRAICER, *J Reprod Fert* 29: 387. 1972.
- 13) AYALON, D., A. TSAFRIRI, H. R. LINDNER, T. CORDOVA, and A. HARELL, *J Reprod Fert* 31: 51. 1972.
- 14) EDWARDS, R. G., *Nature* 208: 349. 1965.
- 15) 豊田 裕, 家畜繁殖誌 8: 4. 1962.
- 16) CHRISTENSON, C. M., and B. E. ELEFTHRIOU, J

- Reprod Fert 29: 287. 1972.
- 17) WHITTEN, W.K. J Endocrinol 13: 399. 1956.
 - 18) PARKES, A.S., and H.M. BRUCE, Science 134: 1049. 1961.
 - 19) ELEFThERIOU, B.E., D.W. BAILEY, and M.X. ZARROW, J Reprod Fert 31: 155. 1972.
 - 20) KLUG, W.S., R.C. KING, and J.M. WATTIAUX, J Exp Zool 174: 125. 1970.
 - 21) COLAIANNE, J.J., and A.E. BELL, Genetics 65: 619. 1970.
 - 22) MOHAN, J., J Embryol exp Morph 25: 237. 1971.
 - 23) OAKBERG, E.F., Amer J Anat 99: 391. 1956.
 - 24) OAKBERG, E.J., Amer J Anat 99: 507. 1956.
 - 25) ROOSEN-RUNGE, E.C., Biol Rev 37: 343. 1962.
 - 26) OHNO, S., W.D. KAPLAN, and R. KINOSHITA, Exp Cell Res 19: 637. 1960.
 - 27) OHNO, S., W.D. KAPLAN, and R. KINOSHITA, Exp Cell Res 12: 395. 1957.
 - 28) 柳沢嘉一郎, 蛋白質 核酸 酵素 10: 7. 1965.
 - 29) HUNT, D.M., and D.R. JOHNSON, J Embryol exp Morph 26: 111. 1971.
 - 30) GUMBRECK, L.G., A.J. STANLEY, J.E. ALLISON, and R.B. EASLEY, J Exp Zool 180: 333. 1972.
 - 31) KOEFORD-JOHNSEN, H.H., and H. PEDERSEN, J Reprod Fert 26: 77. 1971.
 - 32) BENNETT, D., and L.C. DUNN, J Reprod Fert 13: 421. 1967.
 - 33) DUNN, L.C., and D. BENNETT, J Reprod Fert 20: 239. 1969.
 - 34) CHANG, M.C., Nature 168: 697. 1951.
 - 35) AUSTIN, C.R. Nature 170: 326. 1952.
 - 36) YANAGIMACHI, R., J Exp Zool 170: 269. 1969.
 - 37) PAVLOK, A., and A. McLAREN, J Reprod Fert 29: 91. 1972.
 - 38) MIYAMOTO, H., and M.C. CHANG, J Reprod Fert 30: 309. 1972.
 - 39) GWATKIN, R.B.L., O.F. ANDERSEN, and C.F. HUTCHINSON, J Reprod Fert 30: 389. 1972.
 - 40) BAVOS, C., J. ARRAU, and E. HERRERA, J Reprod Fert 28: 67. 1972.
 - 41) ALLISON, A.C., and E.F. HARTREE, J Reprod Fert 21: 501. 1970.
 - 42) BENITEZ-BRIBIESCA, L., and S. VELÁZQUEZ-MEZA, J Reprod Fert 29: 419. 1972.
 - 43) PEDERSON, H., J Reprod Fert 31: 99. 1972.
 - 44) IWAMATSU, T., M.C. CHANG, J Reprod Fert 31: 237. 1972.
 - 45) YANG, W.H., L.L. LIN, J.R. WANG, and M.C. CHANG, J Exp Zool 179: 191. 1972.
 - 46) GWATSKIN, R.B.L., D.T. WILLIAMS, J.F. HARTMANN, and M. KNIAZUK, J Reprod Fert 32: 259. 1973.
 - 47) CONRAD, K., J. BUCKLEY, and R. STAMBAUGH, J Reprod Fert 27: 133. 1972.
 - 48) KRZANOWSKA, H., J Reprod Fert 31: 7. 1972.
 - 49) BAVOS, C., and R. YANAGIMACHI, J Exp Zool 180: 251. 1972.
 - 50) SZOLLOSI, D., J Cell Biol 25: 545. 1965.
 - 51) AUSTIN, C.R., In Preimplantation Stages of Pregnancy, G. E. W. WOLSTENHOLME, M. and O'CONNOR Ed J. & A. Churchill, LTD. London. 1965.
 - 52) DONAHUE, R.P., J Exp Zool 180: 305. 1972.
 - 53) HUNTER, R.H.F., J Reprod Fert 29: 395. 1972.
 - 54) BACSICH, P., and W.J. HAMILTON, J Embryol exp Morph 2: 81. 1954.
 - 55) WHITTEN, W.K., and C.P. DAGG, J Exp Zool 148: 173. 1961.
 - 56) MAURER, R.R., R.H. WHITTEM, and R.H. FOOTE, Proc Soc Exp Biol Med 131: 882. 1969.
 - 57) MARTIN, P.A. and E.L. SHAVER, Devel Biol 28: 480. 1972.
 - 58) MINTZ, B., J Exp Zool 157: 85. 1964.
 - 59) WOODLAND, H.R., and C.F. GRAHAM, Nature 221: 327. 1969.
 - 60) KNOWLAND, J., and C. GRAHAM, J Embryol exp Morph 27: 167. 1972.
 - 61) MONESI, V., and V. SALFI, Exp Cell Res 46: 632. 1967.
 - 62) ELLEM, K.A.O., and R.B.L. GWATKIN, Devel Biol 18: 311. 1968.
 - 63) PIKÓ, L., Devel Biol. 21: 257. 1970.
 - 64) SZOLLOSI, D., In the Biology of the Blastocyst R.J. BLANDAN Ed The University of Chicago Press. Chicago and London. 1971.
 - 65) SUGAWARA, S., and M. UMEZU, Tohoku J Agric Res 12: 17. 1961.
 - 66) FRIDHANDLER, L., Exp Cell Res 22: 303. 1961.
 - 67) MILLS, R.M., JR, and R.L. BRINSTER, Exp Cell Res 47: 337. 1967.
 - 68) BRINSTER, R.L., J Reprod Fert 10: 227. 1965.
 - 69) BRINTTER, R.L., Exp Cell Res 47: 634. 1967.
 - 70) WALES, R.G., and R.L. WHITTENGHAM, Biochim Biophys Acta 148: 703. 1967.
 - 71) BRINSTER, R.L., Exp Cell Res 47: 271. 1967.
 - 72) BRINSTER, R.L., Exp Cell Res 51: 330. 1968.
 - 73) BRINSTER, R.L. In The Biology of the Blastocyst R.J. BLANDAU Ed The University of Chicago Press. Chicago and London. 1971.
 - 74) THOMSON, J.L., and R.L. BRINSTER, Anat Rec 155: 97. 1966.
 - 75) WILSON, I.B., E. BOLTON, and R.H. CUTTLER, J Embryol exp Morph 27: 467. 1972.
 - 76) BARLOW, P., D.A.J. OWEN, and C. GRAHAM, J Embryol exp Morph 27: 431. 1972.
 - 77) STORRS, E.E., and R.J. WILLIAMS, Proc Natl Acad Sci US 60: 910. 1968.
 - 78) HILLMAN, N., M.I. SHERMANN, and C. GRAHAM, J Embryol exp Morph 28: 263. 1972.

- 79) TARKOWSKI, A.K., *Nature* **190**: 857. 1961.
- 80) MINTZ, B., *Am Zoologist* **2**: 432. 1962.
- 81) TARKOWSKI, A.K., *J Embryol exp Morph* **12**: 575. 1964.
- 82) MINTZ, B., and W.W. BAKER, *Proc Natl Acad Sci US* **58**: 592. 1967.
- 83) McLAREN, A., and P. BOWMAN, *Nature* **224**: 238. 1969.
- 84) GEAHART, J.D., and B. MINTZ, *Devel Biol* **29**: 27. 1972.
- 85) McLAREN, A., A.C. CHANDLEY, and S. KOFMAN-ALFARO, *J Embryol exp Morph* **27**: 515. 1972.
- 86) MOUSTAFA, L.A., and R.L. BRINSTER, *J Exp Zool* **181**: 181. 1972.
- 87) MOUSTAFA, L.A., and R.L. BRINSTER, *J Exp Zool* **181**: 193. 1972.
- 88) STERN, M.S., and I.B. WILSON, *J Embryol exp Morph* **28**: 247. 1972.
- 89) STERN, M.S., *J Embryol exp Morph* **28**: 255. 1972.
- 90) RUSSELL, W.L., L.B. RUSSEL, and J.S. GOWER, *Proc Natl Acad Sci US* **45**: 554. 1959.
- 91) MORRIS, T., *Genet Res* **12**: 125. 1968.
- 92) SMITH, L.J., *J Exp Zool* **132**: 51. 1956.
- 93) CALARCO, P.G., and E.H. BROWN, *J Exp Zool* **168**: 169. 1968.
- 94) CALARCO, P.G., and E.H. BROWN, *J Exp Zool* **171**: 253. 1969.
- 95) ENDERS, A.C., In *The Biology of the Blastocyst* R.J. BLANDAU Ed The University of Chicago Press. Chicago and London. 1971.
- 96) KRISHNAN, R.S., and J.C. DANIEL, JR, *Science* **158**: 490. 1967.
- 97) GULYAS, B.J., and R.S. KRISHNAN, In *The Biology of the Blastocyst* R.J. BLANDAU Ed The University of Chicago Press. Chicago and London. 1971.
- 98) DAVIES, J., and H. HESSELD AHL, In *The Biology of the Blastocyst* R.J. BLANDAU Ed The University of Chicago Press. Chicago and London. 1971.
- 99) HEDLUND, K., O. NILSSON, S. REINUS, and G. ÅMAN, *J Reprod Fert* **29**: 131. 1972.
- 100) McLAREN, A., *J Embryol exp Morph* **23**: 1. 1970.
- 101) BOWMAN, P., and A. McLAREN, *J Embryol exp Morph* **24**: 331. 1970.
- 102) BERGSTRÖM, S. *J Reprod Fert* **31**: 275. 1972.
- 103) KIRCHNER, C., *J Embryol exp Morph* **28**: 177. 1972.
- 104) BLANDAU, R.J. In *The Biology of the Blastocyst* R.J. BLANDAU Ed The University of Chicago Press. Chicago and London. 1971.
- 105) KIRBY, D.R.S., In *The Biology of the Blastocyst* R.J. BLANDAU Ed The University of Chicago Press. Chicago and London. 1971.
- 106) TACHI, S., C. TACHI, and H.R. LINDNER, *J Reprod Fert* **21**: 37. 1970.
- 107) ENDERS, A.C., and S.J. SCHLAFKE, *Amer J Anat* **125**: 1. 1969.
- 108) GARDNER, R.L., and M.H. JOHNSON, *J Embryol exp Morph* **28**: 279. 1972.
- 109) BITTON-CASIMIRI, V., J.L. BRUN, and A. PSYCHOYOS, *J Reprod Fert* **27**: 461. 1971.
- 110) NALVANDOV, A.V., In *The Biology of the Blastocyst* R.J. BLANDAU Ed The University of Chicago Press. Chicago and London. 1971.
- 111) 吉永浩二, *家畜繁殖誌* **6**: 155. 1961.
- 112) McLAREN, A., *J Endocrinol* **42**: 453. 1968.
- 113) RUTH, E., and R.J. BLANDAU, In *The Biology of the Blastocyst* R.J. BLANDAU Ed The University of Chicago Press. Chicago and London. 1971.
- 114) YOSHINAGA, K., and C.E. ADAMS, *J Reprod Fert* **12**: 593. 1966.
- 115) LABHSETWAR, A.P., *J Reprod Fert* **27**: 391. 1971.
- 116) SANYAL, M.K., and R.M. MEYER, *J Reprod Fert* **29**: 439. 1972.
- 117) GWATKIN, R.B.L., *J Cell Physiol* **68**: 335. 1966.
- 118) SHERMAN, M.I., and P.W. BARLOW, *J Reprod Fert* **29**: 123. 1972.
- 119) BRUCE, H.M., *J Reprod Fert* **1**: 96. 1960.
- 120) BRUCE, H.M., *J Reprod Fert* **1**: 311. 1960.
- 121) BRUCE, H.M., R.B. LAND, and D.S. FALCONER, *J Reprod Fert* **15**: 289. 1968.
- 122) CARR, D.H., In *The Biology of the Blastocyst* R.J. BLANDAU Ed The University of Chicago Press. Chicago and London. 1971.
- 123) BEHRMAN, S.J., In *The Biology of the Blastocyst* R.J. BLANDAU Ed The University of Chicago Press. Chicago and London. 1971.
- 124) WEISER, R.S., In *The Biology of the Blastocyst* R.J. BLANDAU Ed The University of Chicago Press. Chicago and London. 1971.
- 125) 富田 武, *遺伝学雑誌* **35**: 291. 1960.
- 126) WAKASUGI, N., T. TOMITA, and K. KONDO, *J Reprod Fert* **13**: 41. 1967.
- 127) WAKASUGI, N. *J. Reprod Fert.* **33** (2) in press.