哺乳動物における体外受精

丹 羽 皓 二

京都大学農学部, 京都市 606

Mammalian Fertilization In Vitro

Koji NIWA

Department of Animal Science, College of Agriculture,
Kyoto University, Kyoto 606

はじめに

精子が卵子に侵入する前に, 雌性生殖器官内の精子には2つの連続的な変化が誘起される。1つは生理学的ないし生化学的な変化と考えられる受精能獲得 (sperm capacitation)^{1,2)} であり, 他の1つは膜段階での微細な形態的变化 (先体反応: acrosome reaction)^{3,4)} である。体内での受精の研究に基づくこれらの現象の発見は, 体外受精成立のために必要な条件として大きな示唆を与えた。事実, とくに受精能獲得現象の発見の3年後 (1954年) には, 交配後一定時間経過した雌ウサギの子宮から回収した精子を用いて, 細胞形態学的見地から確実に思われる体外受精の成功例がウサギで初めて報告され^{5,6)}, さらに1959年には体外受精卵を受容雌ウサギに移殖して正常な産子が得られた⁷⁾。その後, 哺乳動物の体外受精に関する研究は急速に進展したが, その研究内容は2つに分けて考えることができる。1つは種々の動物種において体外受精そのものの可能性を検討することである。この場合, 何らかの方法で一旦成功すれば, より安定した受精率の得られる技術の開発が容易となる。もう一つは, 上記の内容を含む研究の進展と裏表をなすものであるが, 受精の機序を解明するための研究手段として体外受精技術を応用するものである。最近, この種の研究領域が飛躍的に膨張し, 多岐にわたる受精の機序も徐々に明らかにされている。しかし, 精子の受精能獲得⁸⁻²⁶⁾ や先体反応^{11,15-17,19,20,24,27-30)} の機序と受精における意義および精子の卵子への侵入機序^{9,16-18,26,27,30)} についてはす

でに多数のすぐれた総説が発表されているので, ここではこれらの内容についての論議は最少限度にとどめたい。体外受精に関する総説^{17,32-43)} や一般的な解説記事⁴⁴⁻⁵⁷⁾ についても内外において多数発表されているが, 本稿では, とくに動物種ごとの特徴を明確にしながら, 各論的に体外受精技術の発展についてのこれまでの研究成果を概観してみたい。

I. 実験用小哺乳動物の体外受精

ウサギ^{32-34,37,43,55)}

形態学的に確実な証拠のある体外受精の成功例が得られた最初の動物種であるが^{5,6)}, 精子の受精能獲得を体外で誘起させる方法は長い間見出されなかった。したがって初期のほとんどの研究では, 交配雌の子宮内で受精能獲得を誘起させた精子 (子宮精子) が用いられている^{5-7,58-64)}。この場合, 交配後12~20時間の範囲で2時間おきに回収した精子による体外受精率 (93~100%) に有意差は認められない⁶⁴⁾。子宮以外に膈から回収した精子を用いても体外受精は可能であり⁶⁴⁻⁶⁷⁾, 最も高い受精率は交配後12~14時間で回収した精子によって得られている⁶⁴⁾。体外での精子の受精能獲得誘起の試みとして, 子宮液あるいは β -amylase⁶⁸⁾, 好酸性白血球⁶⁹⁾, β -glucuronidase⁷⁰⁾, cyclic AMPやヒト卵胞液⁷¹⁾ の存在下での成功例が報告されているが, 何れも確実な証拠は示されていない⁶⁷⁾。さらに, センダイ virus⁷²⁾ や子宮液⁷³⁾ の存在下, または複雑な組成からなる合成培地⁷⁴⁾ 内で処理された精巣上体精子による体外受精の成功例が報告されて

いる。また、20%ウシ胎児血清を含む TC199 液（非完全合成培地）で²⁷⁵⁾あるいは3時間⁷⁶⁾前培養した精巢上体精子による早期（それぞれ3時間以内および1時間後）の卵子への侵入、および前培養することなしに排卵卵子に授精された射出精子による体外受精^{77,78)}が報告されているが、これらの研究結果は何れも追試による確認がなされていない。cyclic AMP (10^{-6} M), Ca^{2+} (2.5×10^{-3} M) および ionophore A 23187 を含む培地で前培養した射出精子による体外受精の成功例も報告されているが⁷⁹⁾、この場合、用いた卵子が裸化されていたのかどうか、さらに授精後の精子侵入時期についても明確な記載がないので、前培養中に精子の受精能獲得が完全に誘起されたか否かは不明である。

最近、簡単な組成からなる等張 (305 mOsm) および高張 (380 mOsm) の完全合成培地を用いて、射出精子^{80,81)}あるいは精巢上体精子⁸¹⁾を15分間隔で2回洗浄することにより、受精能獲得の誘起されることが報告され、他の研究者^{37,82)}によってもこの事実の一部確認されている。この処理により、精子頭部を被覆している抗原性物質の性質が変わるか完全に除去（受精能獲得）され、受精が可能になると考えられており^{83,84)}、その免疫学的な証拠も得られている⁸⁵⁾。しかし、このシステムでは卵子への精子侵入は遅延し、授精後7~10時間でようやく始まり^{80,81)}、しかも顆粒膜細胞を除去した裸化卵子には侵入しないので⁸⁷⁾、おそらくこの処理のみでは精子の受精能獲得は完全ではなく、処理後に顆粒膜細胞などの排卵産物と共存することによってそれが完成されるものと考えられる。このことは、同様に処理した精子を卵管に注入した時、精子は卵子にすぐには侵入することができず、さらに長時間雌性生殖器官内にとどまった後に始めて侵入しうようになること⁸⁶⁾、および処理直後の精子からは、arylsulfatase, β -N-acetylhexosaminidase および hyaluronidase 等の先体酵素の放出が全くみられない⁸⁷⁾ことから明らかである。筆者らは、精巢上体精子に等張および高張の培地を用いて同様の処理を加えた後、等張培地で10~10.5時間前培養して体外受精を試みた⁸⁸⁾。その結果、何れの前処理精子においても、授精後1~1.25時間以内に卵子への侵入が始まり、その後の発生も正常で48時間後には大部分の侵入卵は8~16細胞期にまで分割した。さらに、裸化卵子においても同様の結果が得られたので^{88,89)}、完全合成培地で10~10.5時間前培養中に精子は受精能獲得（および先体反応）を完成したものと考えられる。

授精用の培地としては、酸性塩溶液に重炭酸塩およびウシ血清 albumin (BSA) を添加した完全合成培地が広

く用いられている^{34,64,88-94)}。この培地は、5%CO₂と95%空気の混合気相下で pH 7.8 を示すが、ウサギ卵子の体外受精は 7.2~7.8⁹⁴⁾、7.6~8.2^{59,60)}あるいは7.8~7.9⁹⁴⁾の広い範囲の pH で可能であり、必ずしも5%CO₂の添加は必要としない⁹⁴⁾。

授精時の精子濃度については、0.6~126×10⁴精子/mlのきわめて広い範囲の濃度が用いられているが^{61,64,90,91)}、5×10⁴精子/ml以下の濃度では受精率は低下し^{95,96)}、40×10⁴精子/ml以上の濃度で安定した高い受精率の得られることが報告されている⁹⁶⁾。

初期の研究において、排卵直後の卵子に受精阻害因子が存在するので、授精前に卵子を数回洗浄することにより受精率の高くなることが報告されたが⁵⁸⁾、その後の研究では、排卵直後の卵管卵子^{91,94)}あるいはまだ卵巣表面に付着している卵子^{62,97,98)}においても高い受精率が得られており、卵子洗浄の効果も確認されていない^{59,67,91-93,95)}。さらに hyaluronidase 処理により顆粒膜細胞を除去した裸化卵子においても受精率は低下しない^{67,88,89,92,95)}。ヒト絨毛性腺刺激ホルモン (HCG) の注射後8~12時間目の排卵直前の卵胞から採取した卵子においても体外受精は可能であり^{93,99-101)}、受精卵を移植後に正常な胎児⁹³⁾あるいは産子^{100,101)}にまで发育しうる。

受精の確認の方法として、授精後4~5時間で卵子を10%不活化ウサギ血清を加えた培地⁹⁰⁾に移して培養を続け、20~25時間後に2~4細胞期にまで分割した卵子を指標としている報告が多い^{62,64,92,94)}。筆者らの方法によると、精子侵入は授精後短時間内に始まるので、授精後4~5時間で卵子を固定・染色して調べると、雌雄両前核、2個の極体および侵入精子尾部を明瞭に認めることができる⁸⁸⁾。卵管内^{58,59,91,92,94,102,108)}、卵巣表面^{45,62,101)}および卵胞^{93,100,101)}から回収した卵子の何れにおいても、授精後2~8細胞期に至るまで培養を続け、受容雌に移植することによって正常な産子が得られているが、体外受精により染色体数異常卵の割合が増加するという報告もあり¹⁰⁴⁾、さらに形態異常を伴った産子の出産例も報告されている¹⁰²⁾。

ゴールデン・ハムスター（ハムスター）^{17,37,43,55)}

体外で受精能を獲得させた精子を用いて卵子の体外受精に成功した最初の動物種である^{105,106)}。この種では、モルモット（後述）と同じように精子の先体反応が光学顕微鏡下で容易に観察されるので、体外受精の研究が急速に進展し、受精の形態的および生化学的研究の実験モデルとして多用されている。しかし、つい最近に至るまで、精子の受精能獲得と先体反応の完全合成培地内での誘起は困難で、このために TYRODE 液^{106,107)}あるいはその修

正培地¹⁰⁸⁻¹¹⁰⁾ にハムスター^{107,111)} やウシ^{112,113)} の卵胞液、不活化血清¹¹³⁻¹¹⁸⁾、異種動物の卵管液^{111,119,120)}、副腎抽出液¹⁰⁸⁾あるいは精子抽出液¹¹⁰⁾が添加されていた。また、顆粒膜細胞が精子の受精能獲得に効果のあることが報告されている^{17,121)}。この場合、顆粒膜細胞を洗浄するとその効果が失われるので、有効成分はその細胞間質にあるものと考えられる。筆者らは、修正 KREBS-RINGER bicarbonate (KRB) 液¹²²⁾ を用いて卵子と精巢上体精子を一諸に培養した¹²³⁾。その結果、6~30個の卵子に一定数の精子を授精すれば、培地の量が少なくなるほど受精率は高くなり、10 μ l 量の培地で84~88%の受精率を得た。同様の実験条件下で裸化卵子には全く精子侵入が認められなかったので、顆粒膜細胞間質などの排卵産物が精子の受精能獲得と先体反応に有効であったと推察できる。事実、精子の受精能獲得は完全合成培地内で誘起できたとしても¹²⁴⁾、大部分の精子の先体反応は、排卵産物の添加後においてのみ生ずる¹²⁵⁾。

一方、ハムスター精子の受精能獲得や先体反応の誘起に有効な成分の分析が進んでいる。卵胞液や血清には先体反応の誘起に有効な albumin 様高分子物質と精子の運動性を活発にする（この現象は最初“activated” motility と呼ばれたが¹²⁶⁾、後に“hyperactivation”と改められた²⁰⁾）と同時に生存性を維持するのに有効な熱に安定な低分子の2つの主要な成分を含んでいる^{113,115)}。このうち高分子物質は albumin と同定され¹²⁷⁾、低分子物質は“精子刺激因子” (sperm-stimulating factor¹¹³⁾) あるいは“精子運動性維持因子” (sperm motility factor: SMF¹²⁸⁾) と呼ばれている。また、ハムスターや他の動物種の精子の抽出液は、ハムスター精子の運動性¹²⁹⁾や先体反応誘起を促進して裸化卵子への侵入能力を高める効果のあることが報告され¹¹⁰⁾、SMF と同じ成分を含むことが示された¹¹⁰⁾。さらに、SMF は精巢上体液¹⁸⁰⁾や副腎抽出液¹³¹⁾にも多量に含まれていることが明らかにされており、その分子量は100~200 daltons と推定されている^{108,110,131)}。最近、精子運動の活性化、先体反応および卵子への侵入は、SMF と同時に catecholamines および BSA の存在下においてのみ成しとげられることが報告されている¹³²⁻¹³⁴⁾。また、副腎抽出液には β -アミノ酸である taurine および hypotaurine が大量に含まれており¹³⁵⁾、この両者はハムスター精子の運動性を維持することが知られた^{135,136)}。これらの β -アミノ酸はさらに、ウシ卵胞液、ウサギとサルの卵管液およびハムスター、モルモット、ヒトの精子にも高濃度に含まれており、物理化学的な性質は SMF に類似している¹³⁶⁾。これらのことから、albumin と catecholamines 以外に SMF の代

りとして taurine あるいは hypotaurine を含む完全合成培地において、ハムスター精子の受精能獲得および先体反応が完全に誘起され^{127,135,136)}、裸化卵子を高率に体外受精させることが可能になった¹³⁷⁾。この体外受精システムをさらに簡単にする試みがなされており¹³⁸⁾、この動物種の受精にかかわる要因分析がより正確にできるようになった。たとえば、精子と卵子の細胞膜間融合に Ca^{2+} が重要な役割を担っていることが知られていたが¹³⁹⁾、さらにこのような完全合成培地を用いて、 Ca^{2+} は精子の運動の活性化、十分な受精能獲得 (Ca^{2+} 欠如下においてもある程度の受精能獲得は可能である)、先体反応と透明帯通過、さらには前核期卵子の2-細胞期への分割に必須であるが、透明帯および卵子細胞膜への精子の接着、卵子に侵入後の精子核の拡散と雌雄両前核の形成には必須でないことが明らかにされた¹⁴⁰⁾。

生体液を含む培地を用いた実験で、幾つかの要因分析が行われている。受精能獲得精子による体外受精率は顆粒膜細胞の有無によって差のないこと^{107,114)}、292~392¹¹⁷⁾あるいは230~343¹⁴¹⁾ mOsmol の浸透圧で最も高いこと、pH6.8~8.2の範囲で精子侵入は可能であるが^{118,142)}、pH7.6の時に最も高いこと¹²⁴⁾などが報告されている。受精の場における精子濃度については、6~60 $\times 10^6$ 精子/mlの範囲で先体反応を起こす精子の割合は最も高く、受精率も高いことが報告されているが¹⁴²⁾、3.4~4.7 $\times 10^6$ 精子/ml¹⁴³⁾あるいはもっと低い濃度(0.6~0.8 $\times 10^6$ 精子/ml)¹²³⁾でも非常に高い受精率が得られている。さらに最近、SMF と catecholamines を含む培地で、精子と卵子の割合がほぼ1:1になるような条件下での体外受精の成功例も報告されている¹⁴⁴⁾。このように体内条件と同じような非常に少ない精子数による体外受精が可能になれば、卵子への精子の侵入様式などについてより正確な分析ができるようになる。逆に非常に高い精子濃度下で大部分の精子に受精能獲得と先体反応を誘起せうようなシステムの開発も¹⁴⁵⁾、両者の現象についての生化学的な研究¹⁴⁶⁻¹⁴⁹⁾を進めるのに役立つ。これまで述べてきたほとんどの研究では、過排卵処理により得た卵管内卵子と精巢上体尾部精子が用いられているが、射出精子¹⁴³⁾や排卵直前の卵胞卵¹¹¹⁾においても体外受精は可能である。ハムスター卵子の体外受精に必要なエネルギー源について調べられたこれまでの報告^{106,110,150)}では、受精の場にすでに種々の基質を含む血清、精巢上体液および排卵産物などが共存するシステムが用いられているので、種々の基質の添加の影響は明らかにされても、各基質の厳密な必要性についての分析は困難であった。より完全な合成培地¹³⁵⁾を用いて行われた最近の研究による

と、ハムスターの洗浄精巢上体精子の受精能獲得と先体反応の誘起には glucose と lactate が必要であるが¹⁵¹⁾、精子の卵子への侵入については調べられていない。

通常体外受精の実験操作は明るい人工照明下で行われるが、とくに蛍光灯の光線に卵子を長時間さらすと、第2成熟分裂の阻害されることが報告されており、赤色などのフィルターを通した光線下で、できるだけ短時間内に卵子を操作することの必要性も指摘されている¹⁵²⁾。

授精後卵子への精子侵入が観察される時間は、受精能未獲得精子で 2.5 時間¹¹⁵⁾、受精能獲得精子で 10 分以内¹¹³⁾とされているが、受精卵のその後の発生を体外で維持するのは困難で^{106,153)}、受容雌に移植後も胎児に發育しない¹⁵³⁾。一方、透明帯除去ハムスター卵子にモルモット¹⁵⁴⁾や他のげっ歯類¹⁵⁵⁾の精子が侵入しうることが 1972 年に初めて見出されたが、その後、他の多くの動物種の精子による侵入例も報告され、異種動物精子の受精能獲得および先体反応の間接的検定のために多用されるようになった(文献 20, 37 および 156 を参照)。さらに、凍結融解後の排卯卵子の体外受精^{157,158)}や 2~3 M (NH₄)₂SO₄ のような高濃度の塩溶液に保存後の死滅卵子透明帯への精子侵入の可能性¹⁵⁹⁾が報告されている。

マウス^{37,43,55)}

1968年に子宮精子による体外受精の成功例が初めて得られ¹⁶⁰⁾、その翌年にはウシ卵胞液を含む培地 (TYRODE 液) を用いて、精巢上体精子による受精成立が報告された¹⁶¹⁾。精巢上体精子は授精後 1 時間で卵子に侵入し始めること、さらに前培養精子は授精後 20 分以内に侵入し始めることから、この動物種においても精子の受精能獲得の必要性が示唆された¹⁶²⁾。1971 年には完全合成培地 (修正 KRB 液) を用いてこのことが確かめられると同時に、安定した高い受精率が得られている^{163,164)}。この動物種では、体外受精の再現性が非常に高く、受精卵の体外培養も比較的容易であるので、以後世界中の異なる研究所から多様な実験成績が報告されるようになった。

培地に添加する基質などについては、BSA^{165,166)}、中間代謝産物 (pyruvate と lactate)¹⁶⁵⁻¹⁶⁷⁾ および glucose¹⁶⁷⁻¹⁶⁹⁾ の精子の受精能獲得と受精における重要性が報告されている。とくに glucose は、精子の受精能獲得の最終段階¹⁶⁷⁾ または先体反応の誘起¹⁶⁹⁾ および卵子透明帯通過^{167,169)} に必要である。体外受精に最適な培地の浸透圧と pH は、それぞれ 308~372 mOsmolal¹¹⁷⁾ と 7.3~7.7¹¹⁸⁾ であるが、pH は精子の受精能獲得よりも卵子への侵入に対して影響をおよぼすらしい¹⁷⁰⁾。Zn²⁺ はマウス精子の受精能獲得誘起を抑制することが知られている^{171,172)}。しかし、Ca²⁺ は精子の運動性維持¹⁷³⁻¹⁷⁵⁾、卵子透明帯へ

の接着^{174,176)} および受精¹⁷³⁾ にとって必須であり、0.34~0.86 mM あるいは 5.13~8.55 mM よりも 1.71 mM 濃度の時に有意に高い受精率が得られている¹⁷⁷⁾。このような条件下で精子の受精能獲得に要する時間は約 1 時間であり¹⁶⁴⁾、精子は透明帯に強く接着して¹⁷⁸⁾、透明帯に侵入できると同時に¹⁶⁴⁾、透明帯除去後の卵細胞質内にも侵入できるようになる¹⁷⁹⁾。しかし、高イオン強度¹⁸⁰⁾、cyclic AMP (0.1 mM)¹⁸¹⁾、および caffeine¹⁸²⁾ はそれぞれ精子の受精能獲得を促進すると報告されている。

精巢上体液および顆粒膜細胞は何れも受精能獲得を促進することが示されたが¹⁸³⁾、精巢上体液はむしろ受精能破壊因子¹⁸⁴⁾ を含んでおり^{173,185,186)}、事実精子を洗浄して精巢上体液を除去しても精子の受精能は全く影響を受けない¹⁸⁷⁾。また、顆粒膜細胞もある条件下ではマウス卵子の体外受精に効果的に作用するかもしれないが¹⁸⁸⁻¹⁹³⁾、完全合成培地での前培養精子¹⁹³⁾あるいは新鮮精巢上体精子¹²³⁾は何れも顆粒膜細胞を有した卵子と同様に裸化卵子にも侵入しうることが知られている。

受精の場における最適精子濃度は約 10~63×10⁴ 精子/ml で¹⁹⁴⁾、高い受精率を得るための最低精子数は卵子 1 個当り 100 匹¹⁹⁴⁾とも 417 匹¹⁹⁵⁾とも言われている。しかし、透明帯除去卵子では、卵子 1 個当り 5~10 匹の受精能獲得精子が存在していれば受精は成立し、受精卵は移植後正常な産子にまで發育する¹⁹⁶⁾。透明帯通過に多数の精子の存在が必要である理由については不明である。精子濃度が低くなれば透明帯を有した卵子の受精率は低下するが^{194,195,197)}、2.5~80×10⁴ 精子/ml¹⁹⁸⁾あるいは 25~900×10⁴ 精子/ml¹⁹⁴⁾の広い範囲で 80%以上の受精率が得られている。一方、200×10⁴ 精子/ml に対して 400×10⁴ 精子/ml 以上あるいは 100×10⁴ 精子/ml 以下の濃度では、受精率は有意に低下し、とくに低精子濃度時の受精率には雄による系統差のあることが報告されている¹⁹⁹⁾。精子濃度と多精子侵入との間にある程度の相関のあることが示唆されている²⁰⁰⁾。

マウスの体外受精において系統差のあることは早くから認められていたが¹⁷³⁾、最近、精子²⁰¹⁻²⁰³⁾、卵子²⁰⁴⁾ およびその両者²⁰⁵⁻²⁰⁷⁾の受精能に明らかな系統差のあることが確認されている。たとえば、CD-1 と C3H²⁰⁵⁾、TO²⁰²⁾ および CBA 系統²⁰⁶⁾の精子は異なる系統のマウス卵子にもよく侵入しうることが、C57BL^{202,205-207)}あるいは KE および KP²⁰⁶⁾の精子は、同系統のみならず他の系統の卵子との受精率も低い。同系統の精子と卵子を用いた実験²⁰⁷⁾あるいはある一系統の精子を用いて幾つかの異なる系統の卵子に授精した実験²⁰⁴⁾では、精子侵入の時期と侵入後の卵子の発生速度に明らかな系統差がみら

れる。ある系統の精子の低受精能は適当な培地を選択することによって改善されうる²⁰⁵⁾。

未成熟の卵胞から採取後、体外培養により第2成熟分裂中期に達した卵子の体外受精も可能であるが^{173,188,208)}、受精後の分割率は低い¹⁸⁸⁾。しかし、そのような受精卵の一部は胎児¹⁸⁸⁾あるいは産子²⁰⁸⁾にまで発育する。第1成熟分裂の如何なる時期の未成熟卵子においても透明帯への精子侵入は可能であるが、卵細胞質内での精子頭部の変形は中期以降に達した卵子において初めて正常に進行する²⁰⁹⁾。しかし、透明帯を除去すると、卵核崩壊直後の卵子においても卵細胞質内で精子核の拡散がみられる²¹⁰⁾。排卵後32時間を経過した卵子にも精子は侵入しうが、12~14時間以上経過すると、ほとんどの侵入卵は何らかの異常を示す²¹¹⁾。排卵直後の卵子(HCG後13時間)と比較して老化卵子(HCG後17時間)では精子侵入と前核形成が促進される²¹²⁾。また、動物自体の老化に伴って卵子の体外受精率が低下するとも²¹³⁾、しないともいわれている²¹⁴⁾。なお、射出精子による体外受精²¹⁵⁾や凍結融解後の排卵卵子の体外受精^{158,216)}も報告されている。

体外受精卵を受容雌に移植後、正常な産子が多くの研究所得られている^{189,191,208,217,218)}。しかし一方では、体外受精により染色体数異常卵の割合の増加することが報告されている²¹⁹⁻²²¹⁾。過排卵誘起処理の際の妊馬血清性腺刺激ホルモン(PMSG)の投与量の増加に伴って、多培体の割合が増加し、これはほとんど多精子受精に起因する²²⁰⁾。また、多培体の出現頻度は卵子や精子の遺伝子型の相違によって影響を受けないとされている²²²⁾。

チャイニーズ・ハムスター^{37,43)}

1969年に最初の成功例が報告されたが²²³⁾、以後確認の報告はない。ゴールデン・ハムスターの卵丘塊(卵子を含む)とともに2~3時間前培養した精管精子を過排卵誘起後の卵管卵子あるいは成熟卵胞から採取した卵子に授精した。培地としては、TYRODE液または1%BSA加HAM F10培地が用いられたが、最高の受精率(22%)は、HAM F10+BSAで前培養した精子と卵管卵子との組合わせで得られた。第2極体と雌雄両前核の存在および围卵腔の拡大が受精の指標とされたが、この動物種の体内受精においても少数例観察されているように²²⁴⁾、精子尾部が卵細胞質内に取り込まれた卵子は見出されていない。掲載された写真からも受精の成立は明らかと思われるが、精子の受精能獲得に必要な条件または精子侵入の時期などについてさらに検討を要する。

ネコ^{37,43)}

子宮精子(射出精子を外科的に注入後に回収)による

体外受精の成功例が1970年に初めて報告された²²⁵⁾。すなわち、HCG注射後30時間の排卵卵子に授精し、26~42時間後に分割卵を受精の指標とした結果、0.5~1時間の子宮内培養精子では受精率は低かったが、2~24時間の培養精子では62%(38/61)の受精率が得られた。卵胞液および顆粒膜細胞を含む培地で前培養した精子も用いられたが、分割卵は得られなかった²²⁵⁾。1977年に、完全合成培地である修正マウス受精卵用培地(BWW液)²²⁶⁾または修正HAM F10培地を用いて体外受精の成功例が報告された²²⁷⁾。すなわち、過排卵卵子を精管精子とともに12~14時間培養後、卵子を新しい培地に移し、その後12時間の間隔で卵子の分割が調べられた。その結果、78~81%の高い受精率が得られ、両者の培地間で受精率に差は認められなかった。筆者ら(未発表)は最近、修正KRB液¹²²⁾を用いて、過排卵卵子を精管-精巢上体尾部精子とともに培養し、4.5~5時間後に検査した結果、7個のうち6個の卵子において侵入精子尾部を伴った明白な受精の初期像(膨化精子頭部と第2成熟分裂終期像、あるいは雌雄両前核と2個の極体)を観察することができた。これらのことから、ネコ精子の受精能獲得は非常に短時間内にしかも容易に誘起されると考えられるが、その必要条件などについてさらに追試による検討が必要である。

スナネズミ³⁷⁾

50%のウシ卵胞液を含むTYRODE液(20~100 μ l)を用いて、過排卵卵子を精巢上体尾部精子とともに培養することによって体外受精の成立することが唯一報告されている²²⁸⁾。この条件下において一部の卵子では授精後3時間で精子の透明帯通過と前核形成が認められ、4~6時間後には受精率は54%に達した。卵胞液を添加しないTYRODE液においても、授精後4~6時間で40%の受精率が得られ、精子の受精能獲得誘起には必ずしも卵胞液は必要でないとされている。しかし、この報告で示された数枚の写真から、受精の確実な証拠を読みとるのはきわめて困難である。事実、筆者ら(第73回日畜学会講演要旨, p.77参照)は、上記の条件以外にも種々の条件下で体外受精を試み、20回の実験で合計199個の卵子を検査したが、精子侵入の証拠は全く見出されなかった。透明帯除去卵子の一部で受精初期の確実な証拠が観察されたが、現時点ではこの動物種の体外受精はきわめて困難と考えられる。このことは、透明帯除去ハムスター卵子に対してもスナネズミ精子の侵入はほとんど起こらないことから推察できる²²⁹⁾。

モルモット^{37,43,55)}

精巢上体精子による自然排卵卵子の確実な体外受精

成功例が1972年に最初に報告され、BWV液²²⁶⁾で精子の受精能獲得(および先体反応)は約8~12時間で誘起されることが示された²³⁰⁾。より簡単な組成の塩溶液(EARLE液)においても精子の受精能獲得誘起と卵子の体外受精が可能であり²³⁰⁾、受精能獲得精子は透明帯除去ハムスター卵子にも侵入しうることが報告された¹⁵⁴⁾。ついで、体外培養により成熟した卵子の体外受精も報告された²³¹⁾。精子の卵子透明帯と卵細胞質内への侵入について電顕レベルでの詳細な観察もなされている²³²⁾。

精子の先体反応誘起に対する Ca^{2+} の重要性が、体外受精により裏付けられた²³³⁾。すなわち、 Ca^{2+} 欠BWV液²²⁶⁾を用いて精子を10~16時間前培養後に裸化卵子を導入し、さらに24時間培養を継続した結果、卵子への精子侵入は全く認められなかった。しかし、卵子導入時に2mM- CaCl_2 を添加すると、10分以内に精子の先体反応が誘起され、2時間以内に全ての卵子に精子侵入が認められた。この Ca^{2+} 依存の先体反応は、各種のリソ磷脂質の存在下で促進される²³⁴⁾。すなわち、lysophosphatidylcholine (85 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、-ethanolamine (210 $\mu\text{g}/\text{ml}$) または -inositol (140 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を含む Ca^{2+} 欠培地(修正TYRODE液)で精子を1時間前培養後に Ca^{2+} を添加すると10分以内にほとんどの精子に同時に先体反応が誘起され、透明帯除去ハムスター卵子に侵入しうようになる。同様の効果が、膜内粒子の可動誘起剤(membrane mobility agent)である A_2C によってもたらされる²³⁵⁾。一方、先体反応を起こした精子だけを分離する方法が開発され²³⁶⁾、そのような精子は少なくとも2時間は透明帯を通過して卵子を受精させる能力を有しているが、透明帯を除去したモルモットおよびハムスター卵子との融合能力は8時間後まで保有されることが明らかにされた²³⁷⁾。さらに、マウス^{238, 239)}やハムスター^{17, 240)}と異なり、先体反応を起こした精子のみが透明帯に強く接着して、卵子内に侵入しうることが観察されている^{20, 236)}。

一方、精子の受精能獲得と先体反応は、 NaCl 、 CaCl_2 、 NaHCO_3 およびlactateからなる簡単な培地(minimal culture medium: MCM)内で3時間以内に誘起されることが示されたが¹⁵⁾、このような条件下において、 Ca^{2+} 欠如下の精子の受精能獲得誘起はpHに左右され、7.8以上の時においてのみ可能であること、また先体反応は Ca^{2+} の存在下においてのみ誘起され、pHが高くなるほど促進されることが報告されている²⁴¹⁾。pH 7.8以下で Ca^{2+} 無添加の場合には、精子の受精能獲得は、モルモット血清やヒト血漿などの生体液の存在下においてのみ誘起される²⁴¹⁾。なお、高pH (10.5)で先体反応が促進的(5分以内)に誘起された精子は容易に卵子に侵入しうるの

で、生理学的に正常と考えられている²⁴¹⁾。MCMを用いて、種々の糖類の影響が調べられている²⁴²⁾。MCM+glucoseでは、とくにglucoseの濃度が1mg/ml以上になると、精子の先体反応の誘起は4時間以上にわたってほぼ完全に抑制され、fructoseやmannoseも同様の抑制効果を有するが、L-fucose、D-galactose、sucroseおよびL-glucoseのような非代謝性の糖には抑制効果がない。このことは、MCMよりもMCM+glucoseで3時間前培養された精子の卵子への侵入時期が著しく遅延することからも確かめられている²⁴²⁾。ただし、先体反応を起こした精子が卵子に侵入するためには、培地に K^{+} の存在することが必要であり、その最適濃度は1~2mMの間であることが報告されている²⁴³⁾。

モルモットでは過排卵誘起は困難であるが、精子がきわめて巨大な先体を有しており、先体反応の観察が容易であることから²²⁰⁾、先体反応に関する研究が活発に行われているが、それらの多くは受精実験を伴っていない。たとえば、界面活性剤²⁴⁴⁾、ionophore A 23187^{245, 246)}、methoxyverapamil²⁴⁷⁾およびcyclic GMP²⁴⁸⁾は精子の受精能獲得誘起を促進して、 Ca^{2+} 依存の先体反応誘起を早める。また、 Ca^{2+} 依存の先体反応誘起は、 Mg^{2+} によって競合的に阻害されることなどが報告されている²⁴⁹⁾。

ラット^{37, 43, 53, 55, 250)}

1968年に透明帯を除去した卵子への精子侵入例が得られたが²⁵¹⁾、透明帯を有した卵子については、子宮精子による体外受精の成功例が1973年に初めて報告された^{252, 253)}。その翌年には完全合成培地(修正KRB液)を用いて精巢上体尾部精子による成功例が報告され^{122, 254)}、受精卵は移植後に胎児および産子にまで發育しうることが知られた¹²²⁾。その後の大部分の研究(後述)は、上記5つの原著報告がなされた米国ウースター研究所のM.C. CHANG博士の研究室で行われたものであり、他の研究室での追試はことごとく失敗に終わっている^{250, 255-257)}。その理由については不明であるが、この動物種では、温度、希釈または他の未知要因などの環境変化に対して精子の抵抗性が弱いので²⁵⁸⁾、研究者の技術的な熟練度が大きな原因の1つになっている可能性がある^{259, 260)}。

ラットの体外受精において最も特徴的なことは、精子濃度が精子の受精能獲得^{261, 262)}と卵子の受精^{269, 261)}に厳密な影響をおよぼすことである。すなわち、最適精子濃度は $20\sim 150\times 10^4$ 精子/mlであり、この濃度より高くても低くても受精率は低下する²⁶²⁾。この最適濃度で精子を5~7時間前培養すれば、精子は授精後30分以内に卵子に侵入し始めるが²⁶¹⁾、より高い濃度^{122, 261)}あるいは低い

濃度²⁶²⁾で前培養した精子の受精能は極端に低下する。しかし、最適濃度の範囲で前培養された精子では、授精時の濃度を極端に低くしても ($1.0 \sim 1.6 \times 10^4$ 精子/ml), 体外受精は可能である²⁶³⁾。一方、体外受精が不可能な高い濃度で前培養された精子を雌の子宮内に注入すると 5~5.5 時間後に体内での受精は成立する²⁶⁴⁾。さらに、高 K/Na 比あるいは cyclic AMP の誘導体を含む条件下では、比較的高い精子濃度 ($300 \sim 600 \times 10^4$ 精子/ml) においても、前培養により精子の受精能獲得が誘起される²⁶⁴⁾。

培地の条件について幾つかの要因分析が行われている。血清 albumin は必須成分であり、 $4^{265)}$ または $10 \text{ mg/ml}^{266)}$ の結晶 BSA の存在下で高い受精率が得られるが、ovalbumin と他の一連の蛋白質は受精に対してほとんど効果が認められない²⁶⁶⁾。Ca²⁺ 欠培地では受精は成立せず²⁶⁷⁾、 $1.7 \text{ mM}^{267)}$ 、 $3.4 \text{ mM}^{268)}$ あるいはそれ以上²⁶⁶⁾ の濃度で最高の受精率の得られることが報告されている。培養中の気相について、空気+5% CO₂ の条件下では培地 (修正 KRB 液)¹²²⁾ の pH は 7.0~7.1 に保たれ受精率も高いが、空気のみ気相下では、8~10 時間の培養後に培地の pH が 7.6~7.8 と高くなり、そのために受精率も低下する²⁶⁸⁾。しかし、ラット卵子の体外受精は 7.4~8.0 の範囲の pH で可能であり、pH 7.8 で最高の受精率が得られるという報告もある¹¹⁸⁾。lactate, pyruvate および glucose は全て基質として裸化卵子の体外受精に必須であるが²¹⁵⁾、glucose は精子の受精能獲得よりもむしろ卵子への侵入時に必要であり、mannose は glucose に代用できるが、fructose や galactose は代用できない²⁶⁹⁾。前述のように、マウス¹⁸⁰⁾ やウサギ⁸⁰⁾ では高イオン強度培地での受精能獲得の促進現象が報告されているが、ラットでは対照 (309 mOsmolal) に比較して $357 \sim 397 \text{ mOsmolal}$ の培地においてわずかに受精能獲得の促進が認められるが、より高いイオン強度 (477 mOsmolal) では、ほとんど瞬間的に精子の運動性が失われる²⁷⁰⁾。

HCG 注射後 6 時間までの卵胞から採取した卵子に比べて 6~10 時間の卵子 (第 1 成熟分裂中期以降) の受精能は著しく増加する²⁷¹⁾。さらに、体外培養により卵核胞期から第 2 成熟分裂中期まで成熟した卵子の体外受精も可能であり、受精率は初期 ($18 \sim 22\%$)²⁷¹⁾ よりも後に行われた研究 ($40 \sim 97\%$)^{272, 273)} で著しく高くなっているが、精子の卵子への侵入時期が遅延し、正常な受精の過程を経る卵子の割合も低い²⁷³⁾。少なくとも体内で第 1 成熟分裂中期に達した後には体外で第 2 成熟分裂中期まで成熟させた卵子では、受精率および正常な発生を続ける卵

子の割合は何れも高い²⁷³⁾。一方、排卵後 4~20 時間の卵子では精子侵入率に差は認められないが、正常な受精過程は、排卵後 12 時間までの卵子においてのみ観察される²⁷¹⁾。透明帯除去卵子への精子侵入も観察されており、この場合もやはり精子の受精能獲得誘起が必要であるが、透明帯通過に要するそれとの間に明らかな質的な相違のあることが示唆されている²⁷⁴⁾。凍結融解後の体外成熟卵子²⁷⁵⁾ および排卵卵子²⁷⁶⁾ の体外受精や射出精子による体外受精²¹⁶⁾ の可能性も報告されている。

その他の要因については、自然排卵卵子よりも過排卵卵子の方が体外受精が容易であること²⁶⁹⁾、正常な受精を得るための培地の量は、 $100 \sim 400 \mu\text{l}$ が適していること^{122, 258)}、少なくとも CD と Long-Evans の両系統のラット間²⁶⁸⁾ および Wistar 系のラット²⁷⁷⁾ においても体外受精率に差のみられないこと、さらに顆粒膜細胞および卵胞液は何れも不安定な条件下では必要であるかもしれないが²⁶⁵⁾、より安定な条件下では受精にとって不可欠でないこと²⁵⁸⁾ などが報告されている。

体外受精卵に由来する産子に小眼症が高率に出現した例が報告されているが、体外受精との因果関係は不明である¹²²⁾。筆者ら (日畜学会第 70 回大会講演要旨, p. 39, 1979 参照) は、同様の移植実験で、産子に少なくとも外観における形態学的異常は何ら認めていない。

リスザル^{37, 278)}

20%の子ウシ血清を含む TC 199 液 ($0.5 \sim 1.0 \text{ ml}$) で 4~6 時間前培養した射出精子による体外受精の成功例が 1973 年に報告された²⁷⁹⁾。PMSG 注射後 44 時間に排卵直前の卵胞から卵子を採取し、上記の培地に浮遊させ、同量 ($0.25 \sim 0.5 \text{ ml}$) の前培養精子液を加えて授精した。授精後 72 時間に至るまで合計 22 個の卵子を検査した結果、11 個が受精の初期徴候 (圍卵腔内への精子侵入、第 2 極体の放出あるいは前核形成) を示し、そのうち 6 個は 2-細胞期に達した²⁷⁹⁾。その後、 $0.5 \sim 2$ 時間の前培養精子と卵胞刺激ホルモン (FSH)-HCG 処理後 4~12 時間の卵胞から回収した卵胞卵との体外受精が報告された²⁸⁰⁾。すなわち、264 個の回収卵のうち 97 個が第 2 成熟分裂中期に達し、そのうち 32 個が受精した (前核期~4-細胞期)。さらに大量の卵胞卵を用いた実験においても、ほぼ同様の体外成熟率 ($233/608 = 38\%$) と体外受精率 ($78/233 = 33\%$) が得られているが、前核期~4-細胞期の受精卵を受容雌に移植しても着床させることはできなかった²⁸¹⁾。受精の時間的経過については、授精後 6 時間までに精子侵入と卵細胞質内で膨化精子頭部および侵入精子尾部が、また 10 時間までに前核形成がそれぞれ観察され、さらに 24~30 時間で 76.6%の受精卵において

第1分割中期像が観察されると報告されている²⁸³⁾。この際、培地に cyclic AMP を添加すると受精率は高まる²⁸²⁾。また受精卵の染色体分析の結果、11.7%の卵子が3倍体であった²⁸²⁾。授精後に第2極体が放出される時間から、精子の受精能獲得に要する時間は最も早くて2時間であると推定されている²⁸³⁾。上記の報告のうち2つにおいて^{281,282)}、受精の指標の1つとして卵細胞質内に侵入精子尾部を確認しているが、その明白な証拠(写真)を示した報告は見当らない。精子の受精能獲得に要する時間についても、直接的な実験による証明が必要と思われる。

イヌ^{37,38,43)}

イヌの発情期間は長く(平均7カ月)²⁸⁴⁾、卵子は卵細胞の段階で排卵されるが²⁸⁵⁾、排卵の予知は困難である²⁸⁶⁾。そこで、卵胞から採取した卵細胞期の卵子を用いて体外受精が試みられている²⁸⁷⁾。すなわち、BWW液²²⁶⁾(0.5 ml)に浮遊させた洗浄射出精子($100\sim 500\times 10^6$ 精子/ml)を採取直後あるいは24~72時間培養(TC 199+20%ウシ胎児血清)後の卵子に授精した結果、7時間後に精子の先体反応と透明帯への侵入が観察された。授精後11~24時間で卵子を固定・染色して検査した結果、何れの成熟段階にある卵子においても精子侵入が認められ、一部の卵子では精子頭部の膨化が観察された²⁸⁷⁾。その後、完全合成培地内での精子の受精能獲得および先体反応の誘起の可能性について調べられ、BWW液²⁸⁶⁾をさらに修正したイヌ精子の受精能獲得用培地(canine capacitation medium)が開発された²⁸⁸⁾。この培地で洗浄射出精子を7時間前培養すると、精子運動性の活性化(ハムスターの項参照)と先体反応の誘起が観察された。このような精子を裸化培養卵子に授精した結果、1~2時間後に71%の卵子に精子侵入が認められた。この培地では、精子の先体反応の誘起に対して Ca^{2+} 、BSA および glucose の存在は必須であり、逆に Mg^{2+} はわずかにそれを遅延させる²⁸⁸⁾。また、MCM(モルモットの項参照)+glucose および BSA の培地でも、精子の先体反応誘起と卵子への侵入は可能であるが、卵子細胞膜との融合は起こらず、 K^+ の必要性が指摘されている²⁸⁸⁾。

ディー・マウス

最近、2種類のディー・マウス(*Peromyscus maniculatus*^{229,289)}および*P. polionotus*²⁸⁹⁾)において体外受精の成功例が報告されている。修正 KRB 液(0.4 ml)¹²²⁾を用いて、*P. maniculatus* の精巣上体尾部精子を9~12時間前培養後に過排卵卵子に授精した結果、19~140(4.5%)よりも254~454(38.9%) $\times 10^6$ 精子/mlの精子濃度において受精率は高かった²²⁹⁾。また、*P. maniculatus*

と*P. polionotus*の両種において、それぞれ同種内あるいは両種間の配偶子による体外受精が試みられている²⁸⁹⁾。この報告では、修正 KRB 液(0.2 ml)¹⁸³⁾で2時間前培養した精巣上体尾部精子が用いられているが、何れの配偶子の組合せにおいても、授精後20~23時間で高い受精率(79~93%)が得られている。しかし、精子の受精能獲得に要する時間について直接的な検討はなされていない。

II. 家畜の体外受精

ヒツジ^{38,40,43,56)}

大型家畜のうちで最も早期(1959年)に基礎的な実験が行われている²⁹⁰⁾。すなわち、射出精子をそのまま排卵卵子に授精しても受精卵は得られなかったが、交配後12~24時間の雌ヒツジの子宮頸あるいは子宮角から回収した精子を用いると、授精後5時間以内に78個中4個の卵子において第2極体の放出あるいは2個の前核形成が認められた。その後、子宮角あるいは卵管内で2~7時間培養した精子を用いて、23個中4個の卵子において精子侵入が認められている²⁹¹⁾。最近、それぞれ蛋白質無添加、3% BSA 添加または20%子ヒツジ血清添加の2種類の完全合成培地を用いて、体外受精の成功例が報告されている²⁹²⁾。すなわち、射出精子を上記の培地(1 ml)で回転と振とうを加えながら3時間前培養後に排卵卵子を添加し、さらに3時間培養を継続した(95%空気+5%CO₂)。その後、卵子を同じ培地に移してさらに48時間培養した結果、精子侵入卵(3.6~14%)と分割卵(3.6~8%)の割合は何れも異なる培地間で差が認められなかった。また、ionophore A 23187 処理により先体反応を誘起させたヒツジ精子は、透明帯除去後の卵子細胞膜と融合できるが、透明帯を通過する能力のないことが報告されている²⁹³⁾。

ブタ^{38,40,43,55,56)}

卵胞卵と排卵卵子を用いた基礎的な実験が1970年に報告されている²⁹⁴⁾。すなわち、卵胞卵については、卵胞液で培養後に子宮精子と卵管液中で授精した時(約19%)、また排卵卵子については、卵管液を受精用培地として、射出精子(44%)または子宮精子(42%)を過排卵卵子に授精した時にそれぞれ最高の受精率が得られた。その後も同一研究者による同様な実験で受精の成立が報告されたが²⁹⁵⁾、受精の指標とされた第2極体の放出と前核形成は何れもその事実が明白には示されていない。事実、ほぼ同様の方法を用いて行われた他の実験では、卵子への精子侵入は確認されていない²⁹⁶⁾。一方、摘出された子宮および卵管内で前培養された射出精子による体外培養

卵胞卵への侵入の可能性が示唆されたが²⁹⁷⁾、後に受精初期の明白な証拠が写真によって示された²⁹⁸⁾。修正 KRB 液¹²²⁾での前培養精子は卵子への侵入が困難であったので、摘出された雌ブタの雌性生殖道内での前培養はブタ精子の受精能獲得誘起に効果のあることが示唆された²⁹⁸⁾。このことは、このような精子と透明帯除去ハムスター卵子との受精実験からも確認されている²⁹⁹⁻³⁰¹⁾。最近、ionophore A 23187 で前処理された射出精子および精巢上体尾部精子による体外受精の成功例も報告されている（豊田ら、日畜学会第 72 回大会講演要旨、p. 144, 1981 および同 73 回大会講演要旨、p. 81, 1982 を参照。）また、Na-pyruvate, Ca-lactate, glucose および子ウシ血清を添加した TC 199 液内³⁰²⁾またはウサギの摘出子宮内³⁰³⁾で前培養された射出精子による透明帯除去後のハムスター^{302,303)}およびブタ³⁰²⁾の卵子への侵入例も報告されているが、これの精子が透明帯を有したブタ卵子に侵入しうるか否かは調べられていない。

ウシ^{88, 40, 43, 55, 56)}

初期の実験で、体外成熟卵胞卵^{304,305)}または排卵直前の卵胞卵²⁹⁶⁾と子宮精子^{296,305)}または射出精子^{296,304)}とによる体外受精が試みられたが、何れも受精の確認は得られなかった。筆者らは、修正 KRB 液¹²²⁾で 20~24 時間培養した卵胞卵と種々の処理を加えた射出精子を用いて体外受精を試み、精子侵入の明確な証拠を得た³⁰⁶⁾。すなわち、培地内で 12~14 時間、発情雌ウシから摘出した子宮または卵管内で 3~4 時間、および発情雌ウサギの生体子宮内で 12~14 時間それぞれ前培養した精子を卵子に授精し、18~21 時間後に検査した結果、それぞれ 0, 18.5, 20.7, および 21.3% の卵子に明瞭な精子侵入が認められた。精子侵入の正確な時期については調べられていないが、同種または異種動物の雌性生殖道内環境はウシ精子の受精能獲得誘起に効果のあることが示唆された。その後、PMSG と prostaglandin F_{2α} (PG) を用いて過排卵誘起を行い、外科的に採取した卵胞卵または卵管卵子に高イオン強度の培地⁸⁰⁾で処理した精子を授精し、56% (14/25) の卵子において前核形成または 2~4 細胞期への分割および表層粒の消失が観察されており、電顕レベルでその正常性が確かめられた³⁰⁷⁾。この高イオン強度処理精子は体外培養後の成熟卵子にも侵入可能である³⁰⁸⁾。同じ方法を用いて行われたさらに大規模な実験から、受精率は PG 処理後卵子採取までの時間によって影響を受け、67~76 時間の卵子では比較的高い受精率が得られるが、若いホルスタイン種雄牛 (5/26=19%) よりも ジャージー種雄牛 (14/28=50%) から得た精子において受精率の高いことが示された³⁰⁹⁾。さらに、凍結

融解精子による体外受精も可能である³¹⁰⁾。ごく最近、4-細胞期の体外受精卵を受容雌に移植して正常な産子が得られた³¹⁰⁾。

体外成熟卵胞卵の正常性を調べるために、卵核胞期の卵胞卵を 22~24 時間培養後に酵素的に透明帯を除去した成熟卵と培地 (NaHCO₃, Na-pyruvate, Ca-lactate, glucose および BSA を含む TC 199 液) 内で 5~6 時間前培養した精巢上体尾部精子との体外受精が試みられている³¹¹⁾。授精後 12~14 時間で検査した結果、575 個の供試卵のうち 510 個 (88.7%) に精子侵入が認められ、261 個 (45.4%) は正常な雌雄両前核を有していた。すなわち、体外成熟卵の約半数において、卵細胞質自体の成熟も正常であることが示唆された³¹¹⁾。

ウシ精子の受精能獲得の指標の 1 つとして、透明帯除去ハムスター卵子への侵入例が幾つか報告されている³¹²⁻³¹⁵⁾。しかし、ハムスター卵子へ侵入しうる条件下で、ウシ卵子への侵入も可能であるか否かについて調べられた報告は少ない^{314,315)}。筆者ら（未発表）は、ウシの卵子に侵入できるように処理した精子²⁹⁸⁾を用いて、透明帯除去ハムスター卵子に授精したが、精子侵入例は得られなかった。

ヤギ

筆者らは、ヤギ射出精子を未経産雌ブタの摘出子宮および卵管内で 5~5.5 時間前培養後に透明帯除去ハムスター卵子に授精した³¹⁶⁾。その結果、授精後 2~5 時間で、それぞれ 52~63% および 38~76% の卵子に精子侵入が認められた。修正 KRB 液¹²²⁾で 5 時間前培養した精子では卵子への侵入はほとんど認められなかったもので、異種動物の雌性生殖道内で精子に何らかの生理的変化が誘起されたと考えられるが、このような精子は透明帯を有した卵子には侵入できず、透明帯を除去した卵子にのみ侵入することが観察されている³¹⁷⁾。

III. ヒトの体外受精^{37, 39, 43, 55)}

体外受精の確実な成功例が 1969 年に初めて報告されて以来³¹⁸⁾、多くの実験成績が報告されるようになったが、卵胞から採取した卵胞卵と射出精子が共通して用いられている以外は、未熟卵胞卵の体外培養時間³¹⁸⁻³²¹⁾、誘起排卵処理後の卵子の採取時期³²²⁻³²⁵⁾、培地の組成や精子の前処理法^{318, 320, 322, 324, 326, 327)}は研究者によってそれぞれ異なっており、精子の受精能獲得に要する時間および精子侵入時期について詳しく調べられた報告は少ない。最近、15% ヒト血清を加えた BWW 液²²⁶⁾を用いて、洗浄射出精子を体外成熟卵子に授精し、2.5 時間以内に精子侵入の始まることが観察された³²⁷⁾。さらに、5 mg BSA/

ml を含む修正 TYRODE 液で 1.5 時間前培養した精子は、排卵直前の卵子に授精後 3 時間以内に侵入し始めることが観察され、約 3~4 時間で精子の受精能獲得の誘起されることが示唆された³²⁵⁾。筆者らも、修正 KRB 液¹²³⁾を用いて 3 時間前培養した精子を同じ培地で培養成熟させた卵子に授精し、10 時間後に 39.6% (19/48) の受精率を得ているので³²⁸⁾、完全合成培地内で比較的容易に精子の受精能獲得が誘起されるものと思われる。

母体へ移植された体外受精卵に由来する正常な子供の出産が 1978 年に初めて報告されて以来³²⁹⁾、おもに卵管障害による不妊婦人の治療手段として体外受精技術の応用の重要性が注目されるようになった。現在、世界中で体外受精卵の移植による妊娠例あるいは出産例が多数報告されているが³³⁰⁻³³⁶⁾、一方ではそのような治療の妥当性についても多くの論評がなされている (たとえば、文献 337~339 を参照)。

ヒトでは男性不妊に関する臨床上の視点から、精子の受精能が予知できれば非常に有用となるが、体外受精を応用してそれを間接的に判定しようとする試みがなされている。たとえば、透明帯除去ハムスター卵子に受精能獲得ヒト精子の侵入しうることが 1976 年に初めて見出されたが³⁴⁰⁾、その後不妊男性の精子による侵入率はきわめて低いことが報告されている³⁴¹⁻³⁴⁴⁾。精子の受精能に影響をおよぼす要因の分析のためにも透明帯除去ハムスター卵子は広く利用されている³⁴⁵⁻³⁵¹⁾。この目的のために、凍結融解後の透明帯除去ハムスター卵子も使用できる³⁵²⁾。なお、マウスやラットの透明帯除去卵子にはヒト精子は侵入することができない^{353,354)}。受精能獲得ヒト精子は、3M(NH₄)₂SO₄+0.1% dextran または 1.5 M MgCl₂+0.1% PVP のような非常に高濃度の塩溶液に保存されたヒト卵子¹⁵⁹⁾あるいは死後数日を経過した死体から回収したヒト卵胞卵³⁵⁵⁾に対しても生存卵子と同じように侵入しうること報告されている。

お わ り に

以上、各論的に体外受精の現況について述べてきたが、ヒト以外の哺乳動物では、長年にわたる基礎研究の積重ねがあるにもかかわらず、体外受精卵の移植により産子の得られている動物はわずかにウサギ、マウス、ラットおよびウシの 4 種に限られ、しかもその実験例数はきわめて少ない。一方、ヒトにおいては、体外受精の技術が臨床上最も有効に利用できるもので、基礎研究の段階を飛越して、一気に臨床応用 (体外受精卵の移植) に向かって研究が進展しているようである。しかし、その可否についての論議は本稿の目的ではない。家畜においても体

外受精の応用がもたらす効果は大きい。たとえば、未成熟や老令の雌、または雌性生殖器官などの疾患により体内での受精が困難になった優良雌からの卵子を有効に利用することができる。さらに、(末)受精卵の凍結保存、精子あるいは受精卵の雌雄分別、種々の遺伝子工学的手法などの諸技術と組合わせることによって、家畜の育種の改良は著しく促進されう。しかし残念ながら、実験用小哺乳動物に比較して、いわゆる狭義の家畜における体外受精の研究はようやく緒についたばかりといっても過言ではない。本稿が、家畜繁殖技術の進歩のために何らかの素材を提供できれば幸いである。

文 献

- 1) AUSTIN, C. R., Aust. J. Sci. Res. Ser. B, 4: 581-586. 1951.
- 2) CHANG, M. C., Nature, 168: 697-698. 1951.
- 3) AUSTIN, C. R. and M. W. H. BISHOP, Proc. R. Soc. Lond. Ser. B, 149: 241-248. 1958.
- 4) PIKÓ, L. and A. TYLER, Proc. Vth Int. Congr. Anim. Reprod. A. I., Trento, 2: 372-377. 1964.
- 5) THIBAUT, C., L. DAUZIER and S. WINTERBERGER, C. R. Soc. Biol., Paris, 148: 789-790. 1954.
- 6) DAUZIER, L., C. THIBAUT and S. WINTERBERGER, C. R. Acad. Sci., Paris, 238: 844-845. 1954.
- 7) CHANG, M. C., Nature, 184: 466-467. 1959.
- 8) AUSTIN, C. R., Int. J. Fertil., 12: 25-31. 1967.
- 9) AUSTIN, C. R., Ultrastructure of Fertilization. Holt, Rinehart and Winston. New York. 1968.
- 10) AUSTIN, C. R., in Advances in Bioscience Vol. 4. (RASPE, G., ed.) 5-11. Pergamon Press. Vieweg. 1970.
- 11) BEDFORD, J. M., Biol. Reprod., Suppl., 2: 128-158. 1970.
- 12) SRIVASTAVA, P. N. and W. L. WILLIAMS, in Control of Human Fertility. 73-83. John Wiley and Sons, Inc., New York. 1970.
- 13) WILLIAMS, W. L., in Biology of Mammalian Fertilization and Implantation. (MOGHISSI, K. S. and E. S. E. HAFEZ, eds.) 19-53. Charles C. Thomas. Springfield, Illinois. 1972.
- 14) McRORIE, R. A. and W. L. WILLIAMS, Ann. Rev. Biochem., 43: 777-803. 1974.
- 15) BARROS, C., in Physiology and Genetics of Reproduction, Part B. (COUTINHO, E. M. and F. FUCHS, eds) 3-24. Plenum Press. New York. 1974.
- 16) CHANG, M. C. and R. H. F. HUNTER, in Handbook of Physiology, Sec. 7. Vol. V. (HAMILTON, D. W. and R. O. GREPP, eds.) 339-351. Amer. Physiol. Soc. Washington, D. C. 1975.
- 17) GWATKIN, R. B. L., Fertilization Mechanisms in Man and Mammals. Plenum Press. New York

- 1977.
- 18) ZANEVELD, L. J. D., Proc. IVth Eur. Steril. Congr., 21-29. 1978.
- 19) YANAGIMACHI, R., in Immunobiology of Gametes. (EDIDIN, M. and M. H. JOHNSON, eds.) 255-289. Cambridge Univ. Press. Cambridge. 1977.
- 20) YANAGIMACHI, R., in Fertilization and Embryonic Development *in Vitro*. (MASTROIANNI, L., JR. and J. D. BIGGERS, eds.) 81-182. Plenum Press. New York. 1981.
- 21) 入谷 明, 遺伝, **27** (11): 33-40. 1973.
- 22) 岩松鷹司, 生物科学, **25**: 215-224. 1973.
- 23) 豊田 裕, 化学と生物, **12**: 446-455. 1974.
- 24) 野田善郎, 代謝, **11**: 1563-1571. 1976.
- 25) 入谷 明, 日畜会報, **48**: 445-452. 1977.
- 26) 入谷 明, 代謝, **16**: 651-659. 1979.
- 27) YANAGIMACHI, R., in Current Topics in Developmental Biology, Vol. 12. (MOSCONA, A. A. and A. MONROY, eds.) 83-105. Academic Press. New York. 1978.
- 28) MEIZEL, S., in Development in Mammals 3. (MARTIN, H. J., ed.) 1-64. North-Holland Publishing Company. Amsterdam. 1978.
- 29) GREEN, D. P. L., in Development in Mammals 3. (MARTIN, H. J., ed.) 65-81. North-Holland Publishing Company. Amsterdam. 1978.
- 30) 柳町隆造, 岩松鷹司, 科学, **44**: 293-299. 1974.
- 31) 豊田 裕, 実験生殖生理学の展開-動物モデルの視点から. 第1版. 鈴木善祐編. 25-36. ソフトサイエンス社. 東京. 1982.
- 32) CHANG, M. C., J. Anim. Sci., **27** (Suppl. 1): 15-22. 1968.
- 33) BRACKETT, B. G., in Advances in the Biosciences, Vol. 4. (RASPE, G., ed.) 73-94. Pergamon Press. Vieweg. 1970.
- 34) BRACKETT, B. G., in The Biology of the Blastocyst. (BLANDAU, R. J., ed.) 329-348. Univ. of Chicago Press. Chicago. 1971.
- 35) CHANG, M. C., in The Functional Anatomy of the Spermatozoon. (AFZELIUS, B. A., ed.) 97-103. Pergamon Press. New York. 1974.
- 36) CHANG, M. C., in Regulation of Growth and Differentiated Function in Eukaryote Cells. (TAWLER, G. P., ed.) 499-507. Raven Press, Publishers. New York. 1975.
- 37) ROGERS, B. J., Gamete Res., **1**: 165-223. 1978.
- 38) BRACKETT, B. G., in BARC, Symposium No. 3 Animal Reproduction. (HAWK, H., ed.) 171-193. Allanheld. Osnun. Montclair. 1979.
- 39) BLANDAU, R. J., Fertil. Steril., **33**: 3-11. 1980.
- 40) WRIGHT, R. W., JR. and K. R. BONDIOLI, J. Anim. Sci., **53**: 702-729. 1981.
- 41) SOUPART, P., in Bioregulators of Reproduction. (JAGIELLO, G. and H. J. VOGEL, eds.) 427-457. Academic Press. New York. 1981.
- 42) ROGERS, B. J., in Bioregulators of Reproduction. (JAGIELLO, G. and H. J. VOGEL, eds.) 459-486. Academic Press. New York. 1981.
- 43) 豊田 裕, 家畜繁殖学-最近の歩み-. 山内 亮編. 153-172. 文永堂. 東京. 1978.
- 44) GOULD, K. G., Feder. Proc., **32**: 2069-2074. 1973.
- 45) BRACKETT, B. G., Environmental Health Perspectives, **24**: 65-71. 1978.
- 46) BAVISTER, B. D., in Fertilization and Embryonic Development *in Vitro*. (MASTROIANNI, L., JR. and J. D. BIGGERS, eds.) 41-60. Plenum Press. New York. 1981.
- 47) BAVISTER, B. D., in *In Vitro* Fertilization and Embryo Transfer. (HAFEZ, E. S. E. and K. SEMM, eds.) 13-29. MTP Press Lim. Lancaster. 1982.
- 48) BARROS, C. and J. LEAL, in *In Vitro* Fertilization and Embryo Transfer. (HAFEZ, E. S. E. and K. SEMM, eds.) 37-49. MTP Press Lim. Lancaster. 1982.
- 49) 花田 章, 農林省畜試年報, No. 17: 107-121. 1971.
- 50) 豊田 裕, 家畜繁殖誌, **19**(5): 11-20. 1973.
- 51) 豊田 裕, 遺伝, **27**(11): 41-47. 1973.
- 52) 豊田 裕, 代謝, **16**: 713-721. 1979.
- 53) 丹羽皓二・三宅正史・入谷 明・西川義正, ホルモンと臨床, **24**: 663-669. 1976.
- 54) 丹羽皓二・入谷 明・先天異常, **21**: 53-64. 1981.
- 55) 丹羽皓二, 哺乳動物の初期発生-基礎理論と実験法-. 妹尾左知丸他編. 191-209, 211-213. 理工学社. 東京. 1981.
- 56) 福井 豊・金川弘司, 畜産の研究, **35**: 11-17. 1981.
- 57) BEDFORD, J. M., in Methods in Mammalian Embryology. (DANIEL, J. C., JR., ed.) 37-63. W. H. FREEMAN and Co. San Francisco. 1971.
- 58) THIBAUT, C. and L. DAUZIER, Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys., **1**: 277-294. 1961.
- 59) BEDFORD, J. M. and M. C. CHANG, Nature, **193**: 898-899. 1962.
- 60) SUZUKI, S. and L. MASTROIANNI, Am. J. Obstet. Gynecol., **93**: 465-471. 1965.
- 61) BRACKETT, B. G. and W. L. WILLIAMS, J. Exp. Zool., **160**: 271-282. 1965.
- 62) SEITZ, H. M., B. G. BRACKETT and L. MASTROIANNI, Biol. Reprod., **2**: 262-267. 1970.
- 63) SEITZ, H. M., G. ROCHA, R. G. BRACKETT and L. MASTROIANNI, Fertil. Steril., **21**: 325-328. 1970.
- 64) DANDEKAR, P. and L. R. FRASER, J. Reprod. Fertil., **46**: 77-81. 1976.
- 65) DAUZIER, L. and C. THIBAUT, Proc. IIIrd Int. Congr. Anim. Reprod. A. I., Cambridge, Sec. I: 58-61. 1956.
- 66) BEDFORD, J. M., J. Reprod. Fertil., Suppl. **2**: 35-48. 1967.
- 67) CHANG, M. C., A. HANADA and D. M. HUNT,

- Nature, **232**: 343-344. 1971.
- 68) KIRTON, K. T. and H. D. HAFS, Science, **150**: 618-619. 1965.
- 69) ERICSSON, R. J., Nature, **221**: 568-569. 1969.
- 70) JOHNSON, W. L. and A. G. HUNTER, Biol. Reprod., **7**: 332-340. 1972.
- 71) ROSADO, A., J. J. HICKS, A. REYES and I. BLANCO, Fertil. Steril., **25**: 821-824. 1974.
- 72) ERICSSON, R. J., D. A. BUTHALA and J. F. NORLAND, Science, **173**: 54-55. 1971.
- 73) BRACKETT, B. G., J. A. MILLS, G. OLIPHANT, H. M. SEITZ, G. G. JEITLES and L. MASTROIANNI, Int. J. Fertil., **17**: 86-92. 1972.
- 74) OGAWA, S., K. SATOH, M. HAMADA and H. HASHIMOTO, Nature, **238**: 270-271. 1972.
- 75) SATO, K., 日不妊会誌, **26**: 243-246. 1981.
- 76) SATO, K., M. KIMURA and Y. SAKUMA, 日不妊会誌, **27**: 302-305. 1982.
- 77) 冲永洋子, 日不妊会誌, **17**: 107-122. 1972.
- 78) KUBO, H., 日不妊会誌, **22**: 78-85. 1977.
- 79) REYES, A., B. GOICOECHEA and A. ROSADO, Fertil. Steril., **29**: 451-455. 1978.
- 80) BRACKETT, B. G. and G. OLIPHANT, Biol. Reprod., **12**: 260-274. 1975.
- 81) BRACKETT, B. G., J. L. HALL and Y. K. OH, Fertil. Steril., **29**: 571-582. 1978.
- 82) AKRUK, S. R., W. J. HUMPHREYS and W. L. WILLIAMS, Differentiation, **13**: 125-131. 1979.
- 83) OLIPHANT, G., Fertil. Steril., **27**: 28-38. 1976.
- 84) OLIPHANT, G. and C. A. SINGHAS, Biol. Reprod., **21**: 937-944. 1979.
- 85) OLIPHANT, G. and B. G. BRACKETT, Biol. Reprod., **9**: 404-414. 1973.
- 86) VIRIYAPANICH, P. and J. M. BEDFORD, J. Exp. Zool., **216**: 169-174. 1981.
- 87) AKRUK, S. R., A. A. FAROOQUI, W. L. WILLIAMS and P. N. SRIVASTAVA, Gamete Res., **2**: 1-13. 1979.
- 88) HOSOI, Y., K. NIWA, S. HATANAKA and A. IRITANI, Biol. Reprod., **24**: 637-642. 1981.
- 89) NIWA, K., Y. HOSOI, K. OHARA and A. IRITANI, Anim. Reprod. Sci., submitted.
- 90) BRACKETT, B. G. and W. L. WILLIAMS, Fertil. Steril., **19**: 144-155. 1968.
- 91) BRACKETT, B. G., Fertil. Steril., **20**: 127-142. 1969.
- 92) FRASER, L. R., P. DANDEKAR and R. VAIDYA, Biol. Reprod., **4**: 229-233. 1971.
- 93) BRACKETT, B. G., J. A. MILLS and G. G. JEITLES, Fertil. Steril., **23**: 898-909. 1972.
- 94) FRASER, L. R. and P. V. DANDEKAR, J. Reprod. Fertil., **33**: 159-161. 1973.
- 95) BRACKETT, B. G., D. E. KILLEN and M. D. PEACE, Fertil. Steril., **22**: 816-828. 1971.
- 96) LAMBERT, R. D., L. G. BLANCHETT and M. TOURIGNY, Anim. Reprod. Sci., **1**: 43-47. 1978.
- 97) BRACKETT, B. G. and J. B. SERVER, Fertil. Steril., **21**: 687-695. 1970.
- 98) HARRISON, R. M. and W. R. DUKELOW, J. Reprod. Fertil., **31**: 483-486. 1972.
- 99) SUZUKI, S. and L. MASTROIANNI, Fertil. Steril., **19**: 716-725. 1968.
- 100) TROTNOW, S., S. AL-HASANI and C. SADTLER, Arch. Gynecol., **231**: 41-50. 1981.
- 101) MILLS, J. A., G. G. JEITLES, JR. and B. G. BRACKETT, Fertil. Steril., **24**: 602-608. 1973.
- 102) FRASER, L. R. and P. V. DANDEKAR, J. Exp. Zool., **184**: 303-312. 1973.
- 103) SEIDEL, G. E., R. A. BOWEN and M. T. KANE, Fertil. Steril., **27**: 861-870. 1976.
- 104) FRASER, L. R., G. R. PATON and R. D. BARNES, J. Reprod. Fertil., **43**: 531-534. 1975.
- 105) YANAGIMACHI, R. and M. C. CHANG, Nature, **200**: 281-282. 1963.
- 106) YANAGIMACHI, R. and M. C. CHANG, J. Exp. Zool., **156**: 361-376. 1964.
- 107) YANAGIMACHI, R., J. Reprod. Fertil., **18**: 275-286. 1969.
- 108) BAVISTER, B. D., R. YANAGIMACHI and R. J. TEICHMAN, Biol. Reprod., **14**: 219-221. 1976.
- 109) BAVISTER, B. D., J. Reprod. Fertil., **38**: 431-440. 1974.
- 110) BAVISTER, B. D. and R. YANAGIMACHI, Biol. Reprod., **16**: 228-237. 1977.
- 111) BARROS, C. and C. R. AUSTIN, J. Exp. Zool., **166**: 317-323. 1967.
- 112) GWATKIN, R. B. L. and O. F. ANDERSEN, Nature, **224**: 1111-1112. 1969.
- 113) YANAGIMACHI, R., J. Exp. Zool., **170**: 269-280. 1969.
- 114) MIYAMOTO, H. and M. C. CHANG, J. Reprod. Fertil., **30**: 309-312. 1972.
- 115) YANAGIMACHI, R., Biol. Reprod., **3**: 147-153. 1970.
- 116) BARROS, C. and A. GARAVAGNO, J. Reprod. Fertil., **22**: 381-384. 1970.
- 117) MIYAMOTO, H. and M. C. CHANG, J. Reprod. Fertil., **33**: 481-487. 1973.
- 118) MIYAMOTO, H., Y. TOYODA and M. C. CHANG, Biol. Reprod., **10**: 487-493. 1974.
- 119) IWAMATSU, T. and M. C. CHANG, J. Exp. Zool., **182**: 211-216. 1972.
- 120) BARROS, C., J. Reprod. Fertil., **17**: 203-206. 1968.
- 121) GWATKIN, R. B. L., O. F. ANDERSEN and C. F. HUTCHINSON, J. Reprod. Fertil., **30**: 389-394. 1972.
- 122) TOYODA, Y. and M. C. CHANG, J. Reprod. Fertil., **36**: 9-22. 1974.
- 123) NIWA, K., H. IMAI, C. I. KIM and A. IRITANI, J. Reprod. Fertil., **58**: 109-114. 1980.
- 124) BAVISTER, B. D., J. Reprod. Fertil., **18**: 544-545. 1969.

- 125) BAVISTER, B. D., J. Reprod. Fertil., **35**: 161-163. 1973.
- 126) YANAGIMACHI, R., J. Reprod. Fertil., **23**: 193-196. 1970.
- 127) LUI, C. W., L. E. CORNETT and S. MEIZEL, Biol. Reprod., **17**: 34-41. 1977.
- 128) BAVISTER, B. D., Proc. 8th Ann. Meet. Soc. Study Reprod., p. 63. 1975.
- 129) HANADA, A. and M. C. CHANG, J. Reprod. Fertil., **46**: 105-114. 1976.
- 130) BAVISTER, B. D., B. J. ROGERS and R. YANAGIMACHI, Biol. Reprod., **19**: 358-363. 1978.
- 131) BAVISTER, B. D., J. Reprod. Fertil., **43**: 363-366. 1975.
- 132) CORNETT, L. E. and S. MEIZEL, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **75**: 4954-4958. 1978.
- 133) BAVISTER, B. D., A. F. CHEN and P. C. FU, J. Reprod. Fertil., **56**: 507-513. 1979.
- 134) CORNETT, L. E., B. D. BAVISTER and S. MEIZEL, Biol. Reprod., **20**: 925-929. 1979.
- 135) MEIZEL, S., C. W. LUI, P. K. WORKING and R. J. MRSNY, Dev. Growth Diff., **22**: 483-494. 1980.
- 136) MRSNY, R. J., L. WAXMAN and S. MEIZEL, J. Exp. Zool., **210**: 123-128. 1979.
- 137) LEIBFRIED, M. L. and B. D. BAVISTER, Gamete Res., **4**: 57-63. 1981.
- 138) YANAGIMACHI, R., in *In Vitro Fertilization and Embryo Transfer*. (HAFEZ, E. S. E. and K. SEMM, eds.) 65-76. MTP Press Lim. Lancaster. 1982.
- 139) YANAGIMACHI, R., Biol. Reprod., **19**: 949-958. 1978.
- 140) YANAGIMACHI, R., Gamete Res., **5**: 323-344. 1982.
- 141) MAHI, C. A. and R. YANAGIMACHI, J. Reprod. Fertil., **35**: 55-66. 1973.
- 142) TALBOT, P., L. E. FRANKLIN and E. M. FUSSELL, J. Reprod. Fertil., **36**: 429-432. 1974.
- 143) TSUNODA, Y. and M. C. CHANG, J. Exp. Zool., **201**: 445-456. 1977.
- 144) BAVISTER, B. D., J. Exp. Zool., **210**: 259-264. 1979.
- 145) MORTON, B., B. J. ROGERS and T. S. K. CHANG, Biol. Reprod., **9**: 356-360. 1973.
- 146) MORTON, B. and L. ALBAGLI, Biochem. Biophys. Res. Comm., **50**: 697-705. 1973.
- 147) MORTON, B. and T. S. K. CHANG, J. Reprod. Fertil., **35**: 255-263. 1973.
- 148) ROGERS, B. J. and B. MORTON, J. Reprod. Fertil., **35**: 477-487. 1973.
- 149) ROGERS, B. J. and B. MORTON, Biol. Reprod., **9**: 361-369. 1973.
- 150) IMAI, H., K. NIWA and A. IRITANI, J. Exp. Zool., **220**: 261-265. 1982.
- 151) DRAVLAND, E. and S. MEIZEL, Gamete Res., **4**: 515-523. 1981.
- 152) HIRAO, Y. and R. YANAGIMACHI, J. Exp. Zool., **206**: 365-369. 1978.
- 153) WHITTINGHAM, D. G. and B. D. BAVISTER, J. Reprod. Fertil., **38**: 489-492. 1974.
- 154) YANAGIMACHI, R., J. Reprod. Fertil., **28**: 477-480. 1972.
- 155) HANADA, A. and M. C. CHANG, Biol. Reprod., **6**: 300-309. 1972.
- 156) 花田 章, 家畜繁殖誌, **27**: 123-125. 1981.
- 157) TSUNODA, Y., T. A. PARKENING and M. C. CHANG, Experientia, **32**: 223-224. 1976.
- 158) PARKENING, T. A. and M. C. CHANG, Biol. Reprod., **17**: 527-531. 1977.
- 159) YANAGIMACHI, R., A. LOFATE, C. B. ODOM, R. A. BRONSON, C. A. MAHI and G. L. NICOLSON, Fertil. Steril., **31**: 562-574. 1979.
- 160) WHITTINGHAM, D. G., Nature, **220**: 592-593. 1968.
- 161) IWAMATSU, T. and M. C. CHANG, Nature, **224**: 919-920. 1969.
- 162) IWAMATSU, T. and M. C. CHANG, J. Exp. Zool., **175**: 271-281. 1970.
- 163) 豊田 裕・横山峯介・星冬四郎, 家畜繁殖誌, **16**: 147-151. 1971.
- 164) 豊田 裕・横山峯介・星冬四郎, 家畜繁殖誌, **16**: 152-157. 1971.
- 165) MIYAMOTO, H. and M. C. CHANG, J. Reprod. Fertil., **32**: 193-205. 1973.
- 166) HOPPE, P. C. and W. K. WHITTEN, J. Reprod. Fertil., **39**: 433-436. 1974.
- 167) 岡本正則・豊田 裕, 日畜会報, **51**: 171-177. 1980.
- 168) HOPPE, P. C., Biol. Reprod., **15**: 39-45. 1976.
- 169) FRASER, L. R. and P. J. QUINN, J. Reprod. Fertil., **61**: 25-35. 1981.
- 170) 青沼 繁・岡部 勝・河合裕一, 薬学雑誌, **96**: 1307-1312. 1976.
- 171) AONUMA, S., M. OKABE and M. KAWAGUCHI, J. Reprod. Fertil., **53**: 179-183. 1978.
- 172) AONUMA, S., M. OKABE, M. KAWAGUCHI and Y. KISHI, J. Reprod. Fertil., **63**: 463-466. 1981.
- 173) IWAMATSU, T. and M. C. CHANG, J. Reprod. Fertil., **26**: 197-208. 1971.
- 174) HEFFNER, L. J., P. M. SALING and B. T. STOREY, J. Exp. Zool., **212**: 53-59. 1980.
- 175) HEFFNER, L. J. and B. T. STOREY, J. Exp. Zool., **218**: 427-434. 1981.
- 176) SALING, P. M., B. T. STOREY and D. P. WOLF, Devel. Biol., **65**: 515-525. 1978.
- 177) MIYAMOTO, H. and T. ISHIBASHI, J. Reprod. Fertil., **45**: 523-526. 1975.
- 178) INOUE, M. and D. P. WOLF, Biol. Reprod., **13**: 340-346. 1975.
- 179) WOLF, D. P., M. INOUE and R. A. STARK, Biol.

- Reprod., **15**: 213-221. 1976.
- 180) OLIPHANT, G. and B. G. BRACKETT, *Fertil. Steril.*, **24**: 948-955. 1973.
- 181) FRASER, L. R., *J. Reprod. Fertil.*, **62**: 63-72. 1981.
- 182) FRASER, L. R., *J. Reprod. Fertil.*, **57**: 377-384. 1979.
- 183) GWATKIN, R. B. L., O. F. ANDERSEN and D. T. WILLIAMS., *J. Reprod. Fertil.*, **41**: 253-256. 1974.
- 184) CHANG, M. C., *Nature*, **179**: 258-259. 1957.
- 185) WEINMAN, D. F. and W. L. WILLIAMS, *Nature*, **203**: 423-424. 1964.
- 186) DAVIS, B. K., *J. Reprod. Fertil.*, **41**: 241-244. 1974.
- 187) HOPPE, P. C., *J. Exp. Zool.*, **192**: 219-222. 1975.
- 188) CROSS, P. C. and R. L. BRINSTER, *Biol. Reprod.*, **3**: 298-307. 1970.
- 189) MIYAMOTO, H. and M. C. CHANG, *J. Reprod. Fertil.*, **30**: 135-137. 1972.
- 190) PAVLOK, A. and A. McLAREN, *J. Reprod. Fertil.*, **29**: 91-97. 1972.
- 191) HOPPE, P. C. and S. PITTS, *Biol. Reprod.*, **8**: 420-426. 1973.
- 192) HOPPE, P. C. and W. K. WHITTEN, *J. Exp. Zool.*, **188**: 133-136. 1974.
- 193) 福田芳詔・岡田 修・豊田 裕, *家畜繁殖誌*, **18**: 73-77. 1972.
- 194) TSUNODA, Y. and M. C. CHANG, *J. Reprod. Fertil.*, **44**: 139-142. 1975.
- 195) FRASER, L. R. and L. M. DRURY, *Biol. Reprod.*, **13**: 513-518. 1975.
- 196) THADANI, V. M., *J. Exp. Zool.*, **219**: 277-283. 1982.
- 197) WOLF, D. P. and M. INOUE, *J. Exp. Zool.*, **196**: 27-38. 1976.
- 198) FUKUDA, Y. and M. C. CHANG, *Arch. Androl.*, **1**: 267-273. 1978.
- 199) STANGER, J. D. and P. QUINN, *Gamete Res.*, **5**: 61-70. 1982.
- 200) FRASER, L. R. and I. MAUDLIN, *J. Reprod. Fertil.*, **52**: 103-106. 1978.
- 201) FRASER, L. R. and L. M. DRURY, *J. Exp. Zool.*, **197**: 13-20. 1976.
- 202) FRASER, L. R., *J. Reprod. Fertil.*, **49**: 83-87. 1977.
- 203) HOPPE, P. C., *Gamete Res.*, **3**: 343-349. 1980.
- 204) KASAI, K., Y. MINATO and Y. TOYODA, *家畜繁殖誌*, **24**: 19-22. 1978.
- 205) PARKENING, T. A. and M. C. CHANG, *Biol. Reprod.*, **15**: 647-653. 1976.
- 206) KALETA, E., *J. Reprod. Fertil.*, **51**: 375-381. 1977.
- 207) NIWA, K., M. ARAKI and A. IRITANI, *Biol.* **22**: 1155-1159. 1980.
- 208) MUKHERJEE, A. B., *Nature*, **237**: 397-398. 1972.
- 209) IWAMATSU, T. and M. C. CHANG, *J. Reprod. Fertil.*, **31**: 237-247. 1972.
- 210) BINOR, Z. and D. P. WOLF, *J. Reprod. Fertil.*, **56**: 309-314. 1979.
- 211) 豊田 裕・福田芳詔, *畜産の研究*, **29**: 1373-1377. 1975.
- 212) FRASER, L. R., *J. Reprod. Fertil.*, **55**: 153-160. 1979.
- 213) WOLF, D. P. and M. HAMADA, *J. Reprod. Fertil.*, **48**: 213-214. 1976.
- 214) PARKENING, T. A. and M. C. CHANG, *J. Reprod. Fertil.*, **48**: 381-383. 1976.
- 215) TSUNODA, Y. and M. C. CHANG, *J. Exp. Zool.*, **193**: 79-86. 1975.
- 216) PARKENING, T. A., Y. TSUNODA and M. C. CHANG, *J. Exp. Zool.*, **197**: 369-374. 1976.
- 217) MUKHERJEE, A. B. and M. M. COHEN, *Nature*, **228**: 472-473. 1970.
- 218) KASAI, K., M. SUGIMOTO and Y. TOYODA, *日畜会報*, **50**: 885-890. 1979.
- 219) FRASER, L. R., H. M. ZANELLOTTI and G. R. PATTON, *Nature*, **260**: 39-40. 1976.
- 220) MAUDLIN, I. and L. R. FRASER, *J. Reprod. Fertil.*, **50**: 275-280. 1977.
- 221) FRASER, L. R. and I. MAUDLIN, *Environ. Health Perspec.*, **31**: 141-149. 1979.
- 222) MAUDLIN, I. and L. R. FRASER, *J. Reprod. Fertil.*, **52**: 107-112. 1978.
- 223) PICKWORTH, S. and M. C. CHANG, *J. Reprod. Fertil.*, **19**: 371-374. 1969.
- 224) PICKWORTH, S., G. YERGANIAN and M. C. CHANG, *Anat. Rec.*, **162**: 197-208. 1968.
- 225) HAMNER, C. E., L. L. JENNINGS and N. J. SOJKA, *J. Reprod. Fertil.*, **23**: 477-480. 1970.
- 226) BIGGERS, J. D., W. K. WHITTEN and D. G. WHITTINGHAM, in *Methods in Mammalian Embryology*. (DANIEL, J. C., Jr., ed.) 86-116. W. H. FREEMAN and Co. San Francisco. 1971.
- 227) BOWEN, R. A., *Biol. Reprod.*, **17**: 144-147. 1977.
- 228) NOSKE, I. G., *Experientia*, **28**: 1348-1350. 1972.
- 229) HANADA, A. and M. C. CHANG, *J. Exp. Zool.*, **203**: 277-286. 1978.
- 230) YANAGIMACHI, R., *Anat. Rec.*, **174**: 9-20. 1972.
- 231) YANAGIMACHI, R., *J. Reprod. Fertil.*, **38**: 485-488. 1974.
- 232) NODA, Y. D. and R. YANAGIMACHI, *Devel. Growth Diff.*, **18**: 15-23. 1976.
- 233) YANAGIMACHI, R. and N. USUI, *Exp. Cell Res.*, **89**: 161-174. 1974.
- 234) FLEMING, A. D. and R. YANAGIMACHI, *Gamete Res.*, **4**: 253-273. 1981.
- 235) FLEMING, A. D., N. S. KOSOWER and R. YANAGIMACHI, *Gamete Res.*, **5**: 19-33. 1982.
- 236) HUNG, T. T. F., A. D. FLEMING and R. YANAGIMACHI, *J. Exp. Zool.*, **217**: 287-290. 1981.
- 237) FLEMING, A. D. and R. YANAGIMACHI, *J. Exp. Zool.*, **220**: 109-115. 1982.

- 238) SALING, P. M. and B. T. STOREY, J. Cell Biol., **83**: 544-555. 1979.
- 239) SALING, P. M., J. SOWINSKI and B. T. STOREY, J. Exp. Zool., **209**: 229-238. 1979.
- 240) PHILLIPS, D. M. and R. M. SHALGI, J. Exp. Zool., **213**: 1-8. 1980.
- 241) HYNE, R. V. and D. L. GARBERS, Biol. Reprod., **24**: 257-266. 1981.
- 242) ROGERS, B. J. and R. YANAGIMACHI, Biol. Reprod., **13**: 568-575. 1975.
- 243) ROGERS, B. J., M. UENO and R. YANAGIMACHI, Biol. Reprod., **25**: 639-648. 1981.
- 244) YANAGIMACHI, R., Biol. Reprod., **13**: 519-526. 1975.
- 245) TALBOT, P., R. G. SUMMERS, B. L. HYLANDER, E. M. KEOUGH and L. E. FRANKLIN, J. Exp. Zool., **198**: 383-392. 1976.
- 246) GREEN, D. P. L., J. Cell Sci., **32**: 137-151. 1978.
- 247) SINGH, J. P., D. F. BABCOCK and H. A. LARDY, Biol. Reprod., **22**: 566-570. 1980.
- 248) SANTOS-SACCHI, J. and M. GORDON, J. Cell Biol., **85**: 798-803. 1980.
- 249) ROGERS, B. J. and R. YANAGIMACHI, Biol. Reprod., **15**: 614-619. 1976.
- 250) QUIGLEY, M. M., in *In Vitro Fertilization and Embryo Transfer*. (HAFEZ, E. S. E. and K. SEMM, eds.) 77-88. MTP Press Lim. Lancaster. 1982.
- 251) TOYODA, Y. and M. C. CHANG, Nature, **220**: 589-591. 1968.
- 252) MIYAMOTO, H. and M. C. CHANG, Nature, **241**: 50-51. 1973.
- 253) MIYAMOTO, H. and M. C. CHANG, Biol. Reprod., **9**: 384-393. 1973.
- 254) TOYODA, Y. and M. C. CHANG, J. Reprod. Fertil., **36**: 125-134. 1974.
- 255) SHALGI, R., N. DEKEL and P. F. KRAICER, J. Reprod. Fertil., **55**: 429-435. 1979.
- 256) KAPLAN, R. and P. F. KRAICER, Gamete Res., **1**: 281-285. 1978.
- 257) QUIGLEY, M. M., Arch. Androl., **5**: 65-66. 1980.
- 258) NIWA, K. and M. C. CHANG, Biol. Reprod., **11**: 463-469. 1974.
- 259) NIWA, K. and M. C. CHANG, J. Reprod. Fertil., **35**: 577-580. 1973.
- 260) NIWA, K., M. MIYAKE, A. IRITANI and Y. NISHIKAWA, J. Reprod. Fertil., **47**: 105-106. 1976.
- 261) NIWA, K. and M. C. CHANG, J. Exp. Zool., **189**: 353-356. 1974.
- 262) NISHIMURA, H., K. NIWA, M. MIYAKE and A. IRITANI, J. Exp. Zool., **223**: 115-119. 1982.
- 263) NIWA, K. and M. C. CHANG, J. Reprod. Fertil., **40**: 471-474. 1974.
- 264) NIWA, K. and M. C. CHANG, Fertil. Steril., **26**: 1266-1272. 1975.
- 265) 宮本 元・石橋武彦, 日畜会報, **46**: 226-229. 1975.
- 266) DAVIS, B. K., Proc. Soc. Exp. Biol. MED., **151**: 240-243. 1976.
- 267) MIYAMOTO, H. and T. ISHIBASHI, J. Reprod. Fertil., **45**: 523-526. 1975.
- 268) DAVIS, B. K., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **157**: 54-56. 1978.
- 269) NIWA, K. and A. IRITANI, J. Reprod. Fertil., **53**: 267-271. 1978.
- 270) NIWA, K. and M. C. CHANG, Biol. Reprod., **13**: 187-189. 1975.
- 271) NIWA, K. and M. C. CHANG, J. Reprod. Fertil., **43**: 435-451. 1975.
- 272) 丹羽皓二, 三宅正史, 入谷 明, 西川義正, 日畜会報, **47**: 654-658. 1976.
- 273) NIWA, K., M. MIYAKE, A. IRITANI and Y. NISHIKAWA, J. Reprod. Fertil., **47**: 105-106. 1976.
- 274) NIWA, K. and M. C. CHANG, J. Reprod. Fertil., **44**: 305-308. 1974.
- 275) KASAI, M., A. IRITANI and M. C. CHANG, Biol. Reprod., **21**: 839-844. 1979.
- 276) NIWA, K., M. KASAI and A. IRITANI, 日畜会報, **50**: 747-752. 1979.
- 277) 三宅正史・丹羽皓二・入谷 明, 日畜会報, **49**: 739-744. 1978.
- 278) DUKELOW, W. R., in *Non-Human Primate models for Study of Human Reproduction*. (KUMAR, T. C. A., ed.) 88-98. S. Karger. Basel. Switzerland. 1980.
- 279) GOULD, K. G., E. M. CLINE and W. L. WILLIAMS, Fertil. Steril., **24**: 260-268. 1973.
- 280) KUEHL, T. J. and W. R. DUKELOW, J. Med. Primatol., **4**: 209-216. 1975.
- 281) KUEHL, T. J. and W. R. DUKELOW, Biol. Reprod., **21**: 545-556. 1979.
- 282) ASAKAWA, T. and W. R. DUKELOW, Biol. Reprod., **26**: 579-583. 1982.
- 283) KUEHL, T. J. and W. R. DUKELOW, J. Reprod. Fertil., **64**: 135-137. 1982.
- 284) HANCOCK, J. L. and I. W. ROWLANDS, Vet. Rec., **61**: 771-776. 1949.
- 285) VAN DER STRICHT, O., Arch. Biol., Paris, **33**: 229-300. 1923. (文献 276 より引用).
- 286) PHEMISTER, R. D., P. A. HOLST, J. S. SPANO and M. L. HOPWOOD, Biol. Reprod., **8**: 74-82. 1973.
- 287) MAHI, C. A. and R. YANAGIMACHI, J. Exp. Zool., **196**: 189-196. 1976.
- 288) MAHI, C. A. and R. YANAGIMACHI, Gamete Res., **1**: 101-109. 1978.
- 289) FUKUDA, Y., M. B. MADDOCK and M. C. CHANG, J. Exp. Zool., **207**: 481-490. 1979.
- 290) DAUZIER, L. and C. THIBAUT, Compt. Rend. Acad. Sci., **248**: 2655-2656. 1959. (文献 38 より引用).

- 291) KRAEMER, D. C., Ph. D. Thesis, Texas Univ. 1966. (THIBAUT, C., in Fertilization, Vol. II, p. 405-435. 1969. および文献 40 より引用).
- 292) BONDIOLI, K. R. and R. W. WRIGHT, JR., J. Anim. Sci., **51**: 660-667. 1980.
- 293) SHAMS-BORHAN, G. and R. A. P. HARRISON, Gamete Res., **4**: 407-432. 1981.
- 294) HARMS, V. E. and D. SMIDT, Ber. Münch. Tierärztl. Wochenschr., **83**: 269-275. 1970.
- 295) MEYER, J. N. and D. SMIDT, Ber. Münch. Tierärztl. Wochenschr., **86**: 104-106. 1973.
- 296) BAKER, R. D. and C. POLGE, Can. J. Anim. Sci., **56**: 105-119. 1976.
- 297) IRITANI, A., E. SATO and Y. NISHIKAWA, 日不妊会誌, **20**: 404-409. 1975.
- 298) IRITANI, A., K. NIWA and H. IMAI, J. Reprod. Fertil., **54**: 379-383. 1978.
- 299) IMAI, H., K. NIWA and A. IRITANI, J. Reprod. Fertil., **51**: 495-497. 1977.
- 300) IMAI, H., K. NIWA and A. IRITANI, J. Reprod. Fertil., **56**: 489-492. 1979.
- 301) IMAI, H., K. NIWA and A. IRITANI, Biol. Reprod., **23**: 481-486. 1980.
- 302) PAVLOK, A., Int. J. Fertil., **26**: 101-106. 1981.
- 303) HANADA, A. and H. NAGASE, 家畜繁殖誌, **27**: 113-118. 1981.
- 304) SREENAN, J., J. Agr. Sci., **75**: 393-396. 1970.
- 305) VON BREGULLA, K., U. GERLACH and R. HAHN, Dtsch. Tierärztl. Wochenschr., **81**: 465-470. 1974.
- 306) IRITANI, A. and K. NIWA, J. Reprod. Fertil., **50**: 119-121. 1977.
- 307) BRACKETT, B. G., Y. K. OH, J. F. EVANS and W. J. DONAWICK, Theriogenology, **9**: 89. 1978.
- 308) BRACKETT, B. G., J. F. EVANS, W. J. DONAWICK, M. L. BOICE and M. A. COFONE, Arch. Androl., **5**: 69-71. 1980.
- 309) BRACKETT, B. G., Y. K. OH, J. F. EVANS and W. J. DONAWICK, Biol. Reprod., **23**: 189-205. 1980.
- 310) BRACKETT, B. G., D. BOUSQUET, M. L. BOICE, W. J. DONAWICK, J. F. EVANS and M. A. DRESSSEL, Biol. Reprod., **27**: 147-158. 1982.
- 311) FULKA, J., JR., A. PAVLOK and J. FULKA, J. Reprod. Fertil., **64**: 495-499. 1982.
- 312) LORTON, S. P. and N. L. FIRST, Biol. Reprod., **21**: 301-308. 1979.
- 313) CALCOTE, R. D., Diss. Abstr. Int., **40B**: 2646B. 1979.
- 314) BRACKETT, B. G., M. A. COFONE, M. L. BOICE and D. BOUSQUEST, Gamete Res., **5**: 217-227. 1982.
- 315) BOUSQUET, D. and B. G. BRACKETT, Theriogenology, **17**: 199-213. 1982.
- 316) KIM, C. I., K. NIWA, H. IMAI and A. IRITANI, J. Exp. Zool., **213**: 181-183. 1980.
- 317) KIM, C. I., 学位論文, 京都大学. 1981.
- 318) EDWARDS, R. G., B. D. BAVISTER and P. C. STEPTOE, Nature, **221**: 632-635. 1969.
- 319) SEITZ, H. M., G. ROCHA, B. G. BRACKETT and L. MASTROIANNI, Fertil. Steril., **22**: 255-262. 1971.
- 320) BAVISTER, B. D., R. G. EDWARDS and P. C. STEPTOE, J. Reprod. Fertil., **20**: 159-160. 1969.
- 321) SOUPART, P. and P. A. STRONG, Fertil. Steril., **25**: 11-44. 1974.
- 322) SOUPART, P. and L. L. MORGENSTERN, Fertil. Steril., **24**: 462-478. 1973.
- 323) 久保春海, 日不妊会誌, **22**: 182-190. 1977.
- 324) EDWARDS, R. G., P. C. STEPTOE and J. M. PURDY, Nature, **227**: 1307-1309. 1970.
- 325) LOPATA, A., R. MCMASTER, J. C. MCBAIN and W. I. H. JOHNSTON, J. Reprod. Fertil., **52**: 339-342. 1978.
- 326) JACOBSON, C. B., J. G. SITES and L. F. ARIAS-BERNAL, Int. J. Fertil., **15**: 103-114. 1970.
- 327) MCMASTER, R., R. YANAGIMACHI and A. LOPATA, Biol. Reprod., **19**: 212-216. 1978.
- 328) NISHIMOTO, T., I. YAMADA, K. NIWA, T. MORI, T. NISHIMURA and A. IRITANI, J. Reprod. Fertil., **64**: 115-119. 1982.
- 329) STEPTOE, P. C. and R. G. EDWARDS, Lancet, **2**: 366. 1978.
- 330) STEPTOE, P. C., R. G. EDWARDS and J. M. PURDY, Br. J. Obstet. Gynaecol., **87**: 757-768. 1980.
- 331) EDWARDS, R. G., P. C. STEPTOE and J. M. PURDY, Br. J. Obstet. Gynaecol., **87**: 737-756. 1980.
- 332) LOPATA, A., W. I. H. JOHNSON, I. J. HOULT and A. L. SPIERS, Fertil. Steril., **33**: 117-120. 1980.
- 333) JOHNSTON, I., A. LOPATA, A. SPIERS, I. HOULT, G. KELLOW and Y. DUPLESSIS, Fertil. Steril., **36**: 699-706. 1981.
- 334) TROUNSON, A. O., J. F. LEETON, C. WOOD, J. WEBB and J. WOOD, Science, **212**: 681-682. 1981.
- 335) WOOD, C., A. TROUNSON, J. LEETON, J. MCTALBOT, B. BUTTERY, J. WEBB, J. WOOD and D. JESSUP, Fertil. Steril., **35**: 502-508. 1981.
- 336) FEICHTINGER, W., S. SZALAY, P. KEMETER, A. BECK and H. JANISCH, Geburtsh. Frauenheilk., **42**: 197-199. 1982.
- 337) SCHLESSELMAN, J. J., Am. J. Obstet. Gynecol., **135**: 135-148. 1979.
- 338) EVANS, M. I. and A. O. DIXLER, J. Am. Med. Assoc., **245**: 2324-2327. 1981.
- 339) TIEFEL, H. O., J. Am. Med. Assoc., **247**: 3235-3242. 1982.
- 340) YANAGIMACHI, R., H. YANAGIMACHI and B. J. ROGERS, Biol. Reprod., **15**: 471-476. 1976.
- 341) ROGERS, B. J., H. VAN CAMPEN, M. UENO, H. LAMBERT, R. BRONSON and R. HALE, Fertil. Steril., **32**: 664-670. 1979.
- 342) KARP, L. E., R. A. WILLIAMSON, D. E. MOORE, K. K. SHY, S. R. PLYMATE and W. D. SMITH, Obstet.

- Gynecol., **57**: 620-623. 1981.
- 343) HALL, J. L., Fertil. Steril., **35**: 457-463. 1981.
- 344) STENCHEVER, M. A., L. R. SPADONI, W. D. SMITH, L. E. KARP, K. K. SHY, D. E. MOORE and R. BE-RGER, Am. J. Obstet. Gynecol., **143**: 91-94. 1982.
- 345) KANWAR, K. C., R. YANAGIMACHI and A. LOPATA, Fertil. Steril., **31**: 321-327. 1979.
- 346) MENGE, A. C. and C. S. BLACK, Fertil. Steril., **32**: 214-218. 1979.
- 347) OVERSTRETT, J. W., R. YANAGIMACHI, D. F. KATZ, K. HAYASHI and F. W. HANSON, Fertil. Steril., **33**: 534-542. 1980.
- 348) HAAS, G. G., JR., J. E. SOKOLOSKI and D. P. WOLF, Am. J. Reprod. Immunol., **1**: 40-43. 1980.
- 349) PRYOR, J. P., W. P. COLLINS, G. LANDON and J. P. P. TYLER, Br. J. Urol., **53**: 660-663. 1981.
- 350) COHEN, J., P. FELTEN and G. H. ZEILMAKER, Fertil. Steril., **36**: 356-362. 1981.
- 351) 星 和彦・斉藤 晃・鈴木雅洲・柳町隆造・林惠子, 日不妊会誌, **27**: 306-312. 1982.
- 352) FLEMING, A. D., R. YANAGIMACHI and H. YANAGI-MACHI, Gamete Res., **2**: 357-366. 1979.
- 353) QUINN, P., J. Exp. Zool., **210**: 497-506. 1979.
- 354) PAVLOK, A., Folia Biol., **26**: 188-193. 1980.
- 355) OVERSTREET, J. W. and W. C. HEMBREE, Fertil. Steril., **27**: 815-831. 1976.