

受精卵移植について

金川 弘 司

はじめに

近年、人医界では体外受精児の成功例が世界中で数百例を超え、わが国でも十数例の成功例が報告されている。更に、夫婦間で行われた体外受精卵を、他人の子宮に移植する受精卵移植が外国の例として報道され、人類に対する冒瀆だとか、医学や医師の思い上がりだとかなど、いろいろな論評がなされている。

しかし、畜産・獣医界では人間のように人道主義・道徳・宗教など倫理上の制約をあまり受けずに、自然の状態における動物の繁殖機能を人為的手段によって生理的な限度を超えて増進させ、その生産手段を向上させることは、畜産・獣医領域においてのみ許される独自の分野である。このために、実験動物や家畜では生殖や繁殖が、神秘でもタブーでもなしに世界中の数多くの研究者によって日夜莫大な研究が押し進められている。

そして、カナダ・アメリカ・ヨーロッパの一部及びニュージーランド・オーストラリアでは10年前から優良雌牛にホルモンを使用して過剰排卵を誘発し、これに優良雄牛からの凍結精液を使用して人工授精を施し、複数の受精卵を作り、その



図1 受精卵移植によって1頭のDONORから生産された6頭の仔牛
(北海道農業開発公社 十勝育成牧場)

後この受精卵を体外に回収して、性周期の同期化された別の雌牛の子宮内に1個ずつ移植する受精卵移植が実用化されている。我が国でもこの数年間に数百頭の試験的の成功例が報告されて、ようやく実用化へ向かいつつある(図1)。

1. 受精卵回収用優良雌牛 (donor、供卵牛)

受精卵を回収するための供卵牛とは血統及び体格が優れているばかりでなく、乳牛の場合は非常に高い牛乳生産性を有し、乳量だけではなしに乳汁中の脂肪率や蛋白質含有量なども高くなければならぬし、この雌牛からの仔牛たちの牛乳生産性も高くなければならぬ。肉牛の場合は肉質が良く、体重増加率が速い牛を指す。このように牛

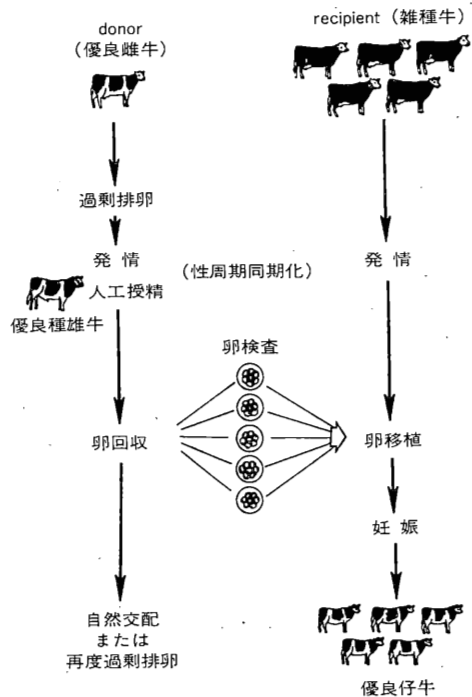


図2 牛受精卵移植技術の概要

表1 牛受精卵移植技術の各段階

№	内 容
1	供卵牛および受卵牛の選択 (伝染病の有無、その他)
2	供卵牛および受卵牛の生殖器検査 (直腸検査)
3	供卵牛および受卵牛の性周期の確立 (発情検査)
4	供卵牛に対する過剰排卵誘発 (性腺刺激ホルモン投与)
5	供卵牛に対する発情の誘発 (プロスタグランジン投与)
6	受卵牛に対する発情同期化 (プロスタグランジン投与)
7	供卵牛および受卵牛の誘発発情の検査 (スタンディング発情の発見)
8	供卵牛に対する人工授精 (凍結精液使用)
9	供卵牛に対する卵回収処置の準備 (直腸検査、絶食)
10	受卵牛に対する卵移植準備 (直腸検査、絶食)
11	供卵牛に対する卵回収処置 (手術的または非手術的子宮還流)
12	回収還流液の検査、卵検査、卵分類、卵取り扱いおよび卵保存 (顕微鏡使用)
13	受卵牛に対する卵移植 (麻酔、手術)
14	供卵牛卵回収処置後の管理 (発情検査、人工授精)
15	受卵牛卵移植後の術後管理 (抜糸、健康管理)
16	受卵牛の妊娠診断 (直腸検査)
17	妊娠受卵牛の健康管理
18	非妊娠受卵牛の処分または再使用 (発情検査)
19	妊娠受卵牛の分娩 (時には帝王切開)
20	新生犢の登録と健康管理 (血液型検査)

では体格審査に併せてコンピューターを使用して、その牛自身の記録と後代検定を採り入れて仔牛たちやその系統全部の記録が徹底的に調べられて牛の価値が定められている。

これらの中から優れた雌牛を供卵牛として選り出し、一度に10頭、20頭の仔牛を生産する受精卵移植技術にはいろいろな段階が必要であり、その主なものは表1と図2に示したとおりである。ちなみに普通の雌牛は性成熟に達するのが生後15～18カ月で、その後21日周期で発情・排卵を繰り返す、妊娠すると約280日の妊娠期間を経て分娩することになる。牛の一生は約15年であるが、性成熟に達してから仔牛を生産して牛乳を搾り得る経済的な繁殖生命は約10年間で、平均すると一生の産仔数は7～8頭である。従って、受精卵移植技術を取り入れることによって、1回の処りで一生、10年分の産仔数を獲得することも可能となり、このような処置を1年間に数回繰り返して10年間も続けると、一生に何十～何百頭もの仔牛を生産することができ得る。

返して10年間も続けると、一生に何十～何百頭もの仔牛を生産することができ得る。

2. 過剰排卵処置

雌牛の卵巣内には何万個という原始卵胞が存在するが、このうち実際に活用されるのは一生を通じて数個である。そこでホルモン剤を使用して何万個と存在する原始卵胞を活性化して、それらを有効に使おうというわけで、現在牛の場合の過剰排卵誘発剤には妊娠馬の血清から抽出される妊娠馬血清性性腺刺激ホルモン(PMSG)、または

下垂体からの卵胞刺激ホルモン(FSH)の2つの性腺刺激ホルモンが使用されている。

これら過剰排卵誘発ホルモン剤の使用に当たっては各雌牛の個体差などが絡み、まだ完全に任意の排卵数を期待することは難しい。例えば子宮を借りる安価な雑種牛(recipient、受卵牛)を10頭準備し、10個の移植卵を期待しても時には10個以上の受精卵が得られて受卵牛不足になることがあるかと思うと、この逆に1～2個しか受精卵が得られず、せっかく性周期同期化をして準備した受卵牛がむだになってしまうことも起こり得る。我々はコンピューターを使用して1,000頭以上の雌牛について、これら過剰排卵誘発剤に影響を与えていると考えられるいろいろな要因の組み合わせ(投与量、製品ムラ、体重、年齢、品種、経産数、季節など)を検討しているが、現在では未経産牛にPMSGを2,000IU、経産牛には3,000IU及び高齢牛には4,000IUを投与することによって

約10個の過剰排卵数を期待できるようになってきた。

過剰排卵処置を行わずに、自然の各発情周期(3週間隔)ごとに1個ずつの受精卵を連続して回収し、移植する方法も行われている。理論的には雌牛は1年間に17回(52週÷3週)の発情を繰り返すので、50%の成功率としても年間8~9頭の仔牛を生産することができ、この方法の有利な点は一度に多数の受卵牛を準備する必要がないことである。

3. 発情コントロール

過去20年ぐらゐの間に家畜では発情時期を規制する研究が盛んに行われてきた。発情とは雌動物が雄を迎え交配に応じる雄許容状態で、卵胞の発育成熟に伴う卵胞ホルモンの影響を受けており、発情終了前後に排卵を伴っている。牛ではこの発情周期が21日(3週間)であるが、この発情を人為的に同期化(性周期同期化)することにより、いろいろな利点、例えば交配時期を一定にすることが可能となり、従って分娩時期も気候の良い若草の出てくる春から初夏に合わせたり、経済的理由から自分の経営や市場の動きなどに合わせて肥育を計画的に行うことも可能となる。

牛の受精卵移植技術の中でも、採卵日や移植日を選定するために供卵牛の発情を同期化することと、供卵牛と受卵牛の性周期が同期化されていることは受精卵移植後の妊娠に関係して必須の技術である。過去にはいろいろな方法が試みられてきたが、現在はプロスタグランジンF₂α(PG)の強い黄体退化作用を応用する方法が一般に行われている。PGを使用する上で大切なことはPG投与時に活発な黄体が存在することで、供卵牛の場合は性腺刺激ホルモンの投与開始日を前回の発情(発情を0日として)から10~13日目の間にし、その2日後(12~15日目)にPG25mgを投与すると、更に2日後(前回の発情から14~17日目)に発情が発現する。現在まで1,000頭以上の実施例で約95%の高い発情誘発率を得ている。この発情コントロールによって手術日や実施日の選定が容易となり、土・日曜及び休日避けることが可能となり、実用化には非常に有効である。

4. 人工授精

牛の人工授精は1952年の精液凍結保存成功以来、飛躍的に進歩し、約30年前前から実用化されており、乳牛の間で100%普及している。1回の射精液を適当に希釈して、凍結保存し1年間に100~150頭の雌牛に授精可能である。従って人工授精用の種雄牛に対しては厳しい淘汰と選抜が行われ、血統、体型及び能力的に優れた優良牛だけが使用されるために、乳牛の改良が著しく促進された。1945年ころは我が国の乳牛の泌乳能力は年間約4,000kgであったが、最近の平均は約6,000kgにまで顕著な増量を示した。このことは人工授精事業の普及が乳牛の改良にいかにか効果的であったかを示している一例であろう。

受精卵移植の場合も、計画的に優良な種雄牛を選抜して、その牛から得られた凍結保存精液を使用して人工授精することによって、スーパー・サイア(最優良雄牛)とエリート・カウ(最優良雌牛)の組み合わせによる優良受精卵を多数得ることが可能となる。供卵牛に過剰排卵処置を施して誘起された発情時に、12時間間隔で2回の人工授精を行っているのが一般的である。

5. 過剰に排卵された受精卵の回収

牛の受精卵移植が商業ベースで始まった1973年に、カナダ・アメリカを通じて一般的に行われていた卵回収方法は、全身麻酔後、仰臥位で乳房と臍の中間の正中線開腹手術による卵管及び子宮内灌流であったし、一部には動物は起立したままで局所麻酔による臍部開腹手術も試みられてきた。しかし、最近になって膣及び子宮頸管を経由する非手術的卵回収方法が広く行われてきている。我が国では農林水産省に居た杉江らが中心となって10年以上もこの問題に取り組んでいる(図3)。

牛の卵は受精後4日間は発育を続けながら卵管内を子宮に向かって下降し、5日目ころ16-分割卵となって卵管・子宮移行部付近に達し、6日目では32-分割卵となって子宮角先端にあるのが普通である。7日目には64-分割卵または桑実胚、8日目には胚盤胞に発育し、9日目には胚盤胞が膨張して大きくなり、10日目には透明帯からの脱出が普通である(図4)。従って卵回収方法も

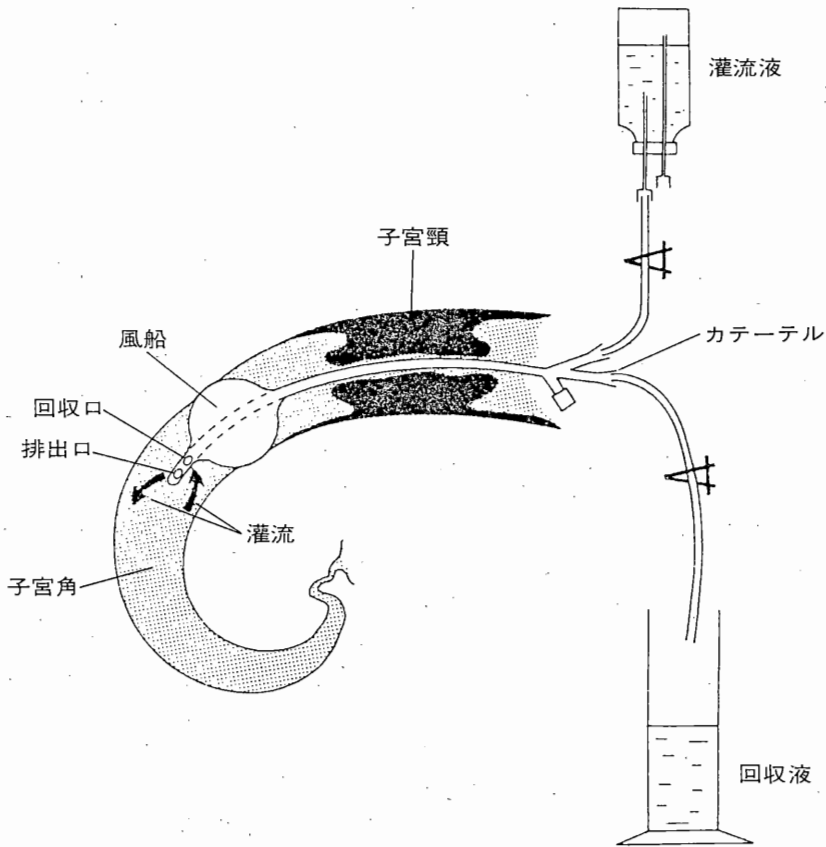


図3. 非手術的卵回収方法の模式図

これら卵の発育過程と部位を理解した上で行わなければならない。例えば人工授精後4日目までは卵管内灌流が必要であるし、非手術的に子宮だけを灌流する場合は6日目以降ということになる。移植後の妊娠率からみると、現在までの成績では7日目前後の桑実胚から良い結果が得られている。

卵回収用灌流液に何が最適かという問題は完全には解決されていないので、各研究者によって異なるが、一般的なのはPBS、MEM、TCM-199、BMOC-3あるいは生理食塩液に仔牛血清を加えて使用している場合もある。

世界的な傾向としては、PBSに10%の仔牛血清を加えた液で卵回収を行い、受精卵の移植や保存にはPBSに20%の仔牛血清を添加している場合が多い。

6. 受精卵の検査と取り扱い

回収された灌流液は実体顕微鏡下で、無菌的に素早く検査して卵の発見に努める。発見された卵は保存液の入った蓋付ガラス製小型シャーレに移して、更に強拡大の倒立顕微鏡下で形態的に調べて移植可能か否かの分類を行う。急激な温度、湿度、震動、蒸発、pHなどの変化を避けるように保存し、移植を待つ(図5)。

7. 受精卵の移植

受精卵の移植方法も回収と同様に、手術的方法には全身麻酔による正中線開腹法及び局所麻酔による臍部開腹法が、非手術的方法には膣門蓋部を小切開して子宮頸管をバイパスする方法と、人工授精に類似の子宮頸管経由の4つの方法がある。現在、最も普通に行われているのは非手術的方法

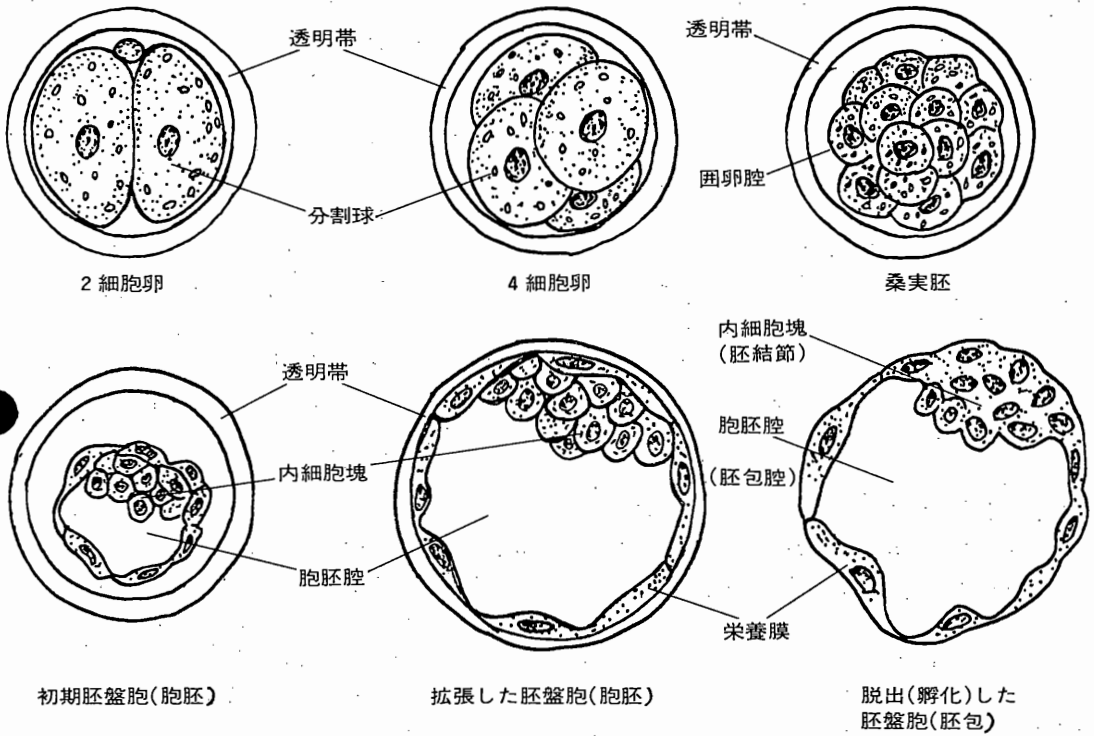


図4. 牛受精卵のいろいろ

のうち子宮頸管を経由する方法である。この場合、黄体期の子宮は発情期の子宮に比べて細菌に対する感受性が高く、細菌感染を起こしやすい。受精卵移植用の注入器をそのまま膈内に挿入すると、外陰部や膈内の細菌などが子宮内に持ち込まれ、子宮内膜炎を誘起しないまでも、移植された受精卵に対して悪影響を与えるような子宮内の環境変化を起こして、着床妨害や不受胎の原因になることが考えられる。従って、受精卵の子宮内移植に際しては十分な無菌的操作が大切である。

受卵牛と供卵牛との性周期

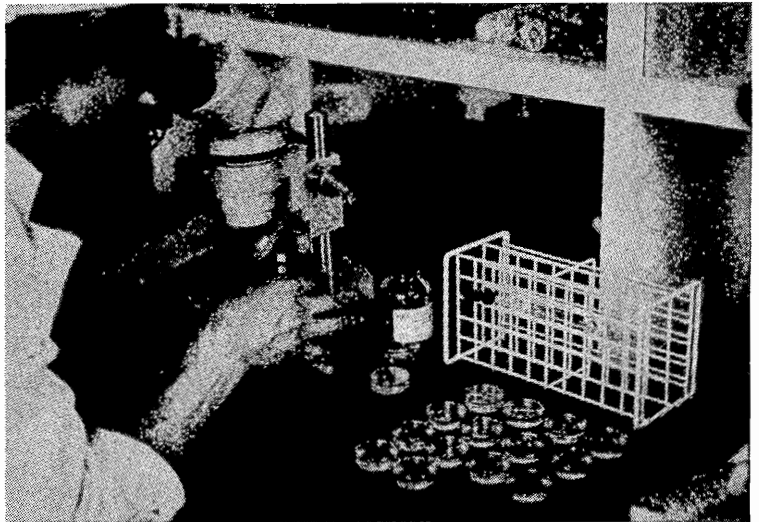


図5. 実体顕微鏡下で子宮灌流液を検索して受精卵を見つけ出す

同期化は大切で、供卵牛に発情があり、人工授精をしてから7日目に回収した桑実胚は、発情後7日目の受卵牛に移植しなければならない。但し、24時間以内のズレでは受胎率に対してあまり影響はみられない。

8. 受精卵移植に関連した研究課題と将来の発展性

近い将来、受精卵移植に関する新しい技術面での研究・開発が、現在行われている商業ベースでの受精卵移植事業にも取り入れられるようになるものと考えられるが、それらの2~3は既に試験段階を経て実用化されつつあるものもあるが、研究段階のものも少なくない。

1. 受精卵の保存

受精卵を自由に任意の期間保存し、必要に応じて受卵牛に移植することが可能であれば、受卵牛側の性周期同期化の必要もなくなるし、多数の受卵牛を常時確保しておく必要もなくなり、経済的には非常に有利になる。

室温(約20℃)及び低温(4℃)に24時間保存した牛受精卵を移植して妊娠した良結果が報告されており、カナダ・アメリカからヨーロッパや中南米に1日以内に受精卵が輸送されて現地の受卵牛に移植され、既に数百頭の仔牛が生産され

ている。

哺乳動物の受精卵を凍結・融解後に移植して産仔を得た成功例は、1972年にWhittinghamらによってマウスで報告され、その後、この分野の研究が著しく進展した。近年、牛受精卵についても凍結保存の成功例が続々と報告され、一部の国では受精卵移植と組み合わせて実用化され出したところもある。しかし、まだ成功率は低く、凍結しない新鮮な牛受精卵の移植では約60%の受胎率が得られているのに、凍結・融解卵の移植ではその半分の約30%の受胎率である。今後は牛凍結保存卵による受精卵移植で、受胎率を向上させることが何よりも大切なことと同様に、より簡単で安価に凍結・融解できる方法を開発しなければならない(図6)。

我が国では昨年(1983年)に家畜改良増殖法の改正があり、条件付きで海外から凍結精液や受精卵を輸入できるようになったが、将来の国際的協力や国際的流通に対処して、受精卵によって輸入国へ持ち込まれる伝染病があるのかなど、受精卵の輸出入と検疫の問題が検討されなければならない。

2. 卵子の体外受精

1959年Changは、家兔の卵子を体外受精し、その移植によって哺乳動物では初めての体外受精

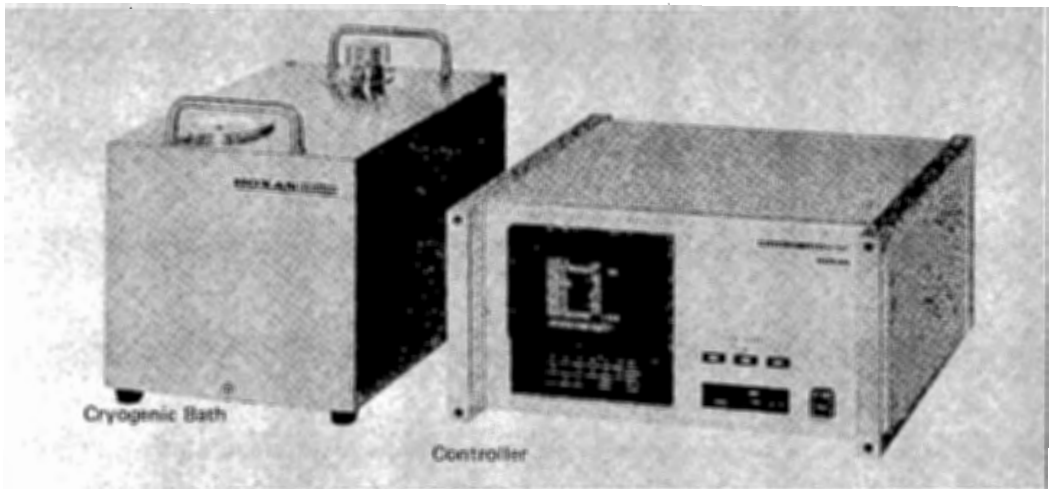


図6. 受精卵凍結・融解用プログラム・フリーザーの一例。左側は凍結槽、右側はマイコン搭載の温度制御装置。

産仔を得た。人においても、体外受精児（試験管ベビー）として1978年 Steptoe & Edwards に よって出産例が報告され、世界的には既に400例 以上の出産例があり、我が国でも1983年、東北 大学での国内初の成功例が報告されて以来10数 例の出産例がある。

人以外の哺乳動物での体外受精に関する研究は 多数報告されているが、その多くは卵子への精子 侵入（精子頭部膨大）、前核形成及び卵割開始の 証明をしているものが主で、体外受精と受精卵移 植を組み合わせる産仔を得ているものは少ない。 人以外の成功例は家兎、マウス、ラット、牛及び 山羊であるが、特に牛及び山羊は世界中でたった 1例のみの成功で、その後の追試はまだ成功して いない。大動物での成功例が少ない理由として、 経済的な理由から大動物を自由に研究材料に使う ことに制限があることと、精子側の受精能獲得と 卵子の成熟の問題が完全に解明されていないこと などが挙げられよう。

3. 受精卵の人為的操作

マイクロマニピュレーターで顕微操作を施し、受 精卵を人為的に分割して1卵性双仔を作出しよう とする試みが進められている。実際に下等動物で はこのような実験に成功していたが、家畜で成功 したのは1979年 Willadsenらがめん羊で成功し たのが最初である。その後、牛や馬でも1卵性双 仔の成功例が報告され出したが、その多くは受精 卵が2～4細胞に分割した初期に、顕微操作によ って2分割または4分割して行った実験である。 1983年に著者らは受精後6日目の桑実胚を2分 割して移植し、妊娠及び産仔を得た（図7）。今 後は受精卵や胚に対する発生工学的研究の上で、 卵細胞の分化の問題を含めて検討する必要がある だろう（図8、9）。

2分割卵の保存方法が確立されれば、2分割し たうちの一方を移植し、残り半分は凍結保存して おき、移植した2分割卵による仔畜の優良性が実 証されてから残りの $\frac{1}{2}$ 凍結卵を融解・移植すること も可能となる。あるいは、片方の分割卵で染色体 分析を行い、性別判定後に残りの分割卵を移植 することによって、生まれてくる仔畜の性別をあ らかじめ知ることができる。2分割卵を移植する

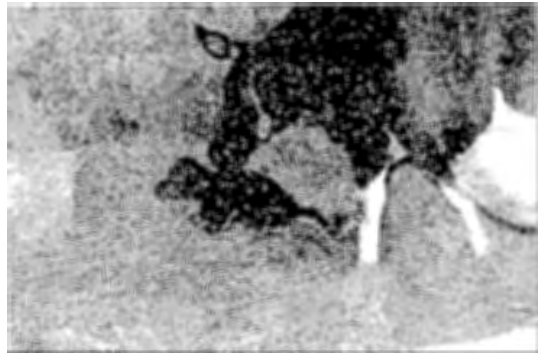


図7 分割受精卵から誕生したわが国最初の仔牛 (1983年12月1日分娩、雪印乳業と北大・ 獣医学部の共同研究)



図8 マイクロマニピュレーターで受精卵の顕微操 作を行っているところ

ことによって産仔数を増加させたり、受胎率を向 上させることができる。例えば凍結受精卵の移植 による受胎率が30%としても、2分割卵2つを

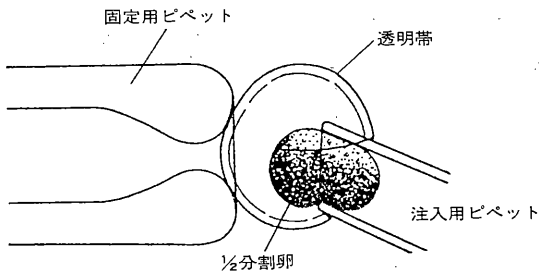


図9. 受精卵顕微操作の一例。
1/2分割卵を空の透明帯に挿入するところ。

合わせて60%の受胎率を期待できることになる。また、1卵性双卵は、育種学や遺伝学などの研究を行う上で、各種の比較実験に対する反応やデータがより正確に得られるようになるばかりでな

く、実験の経費削減にも貢献することになる。(図10)。

今までは受精卵の分割について述べてきたが、受精卵や分割卵を2個以上接着・凝集または融合させて単一の個体を得る試みが、古くはウー胚やイモリ胚で行われていた。1960年代にはマウス胚でも行われ、人工キメラマウスの作出に成功し、1983年にはイギリスでめん羊と山羊の受精卵を融合させて新しい動物を作り出したという報道が行われた。このような哺乳動物や家畜胚の実験発生学は、その遺伝的背景の情報の豊富さを大きな武器として、単なる発生過程の解析の域を超えて実験発生的な「新しい動物」を作り出すことを可能にしたが、医学と獣医学的領域で、生命についての哲学的及び倫理的な新たな論議が必要となろう(図11)。

4. 双仔の生産

牛を例にとると双仔の生産は肉牛生産または肉

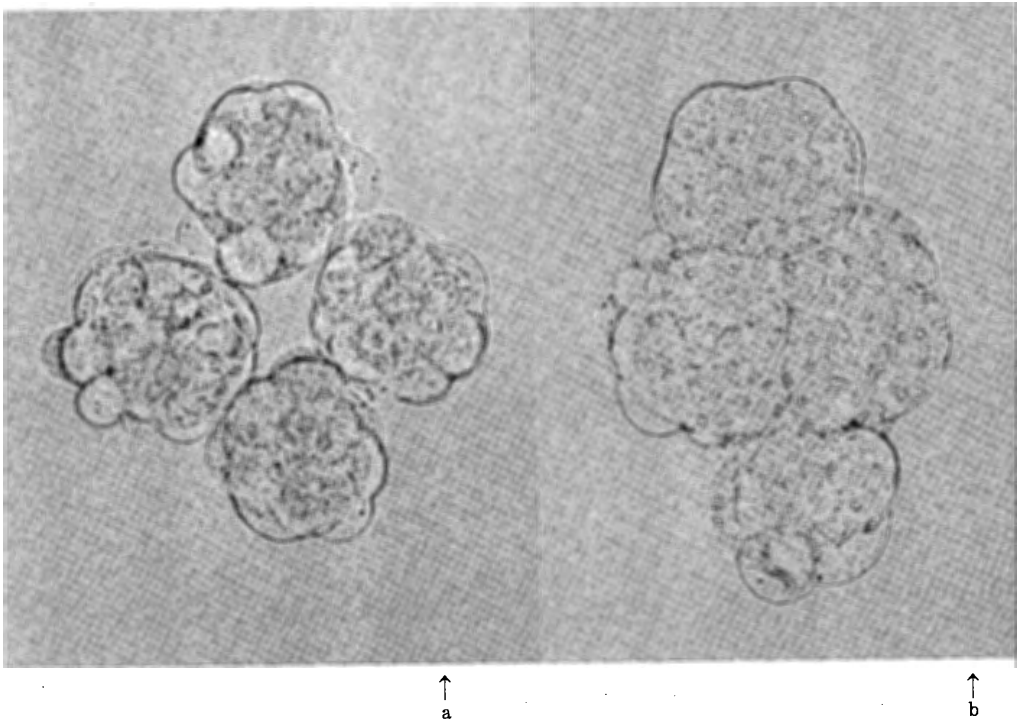
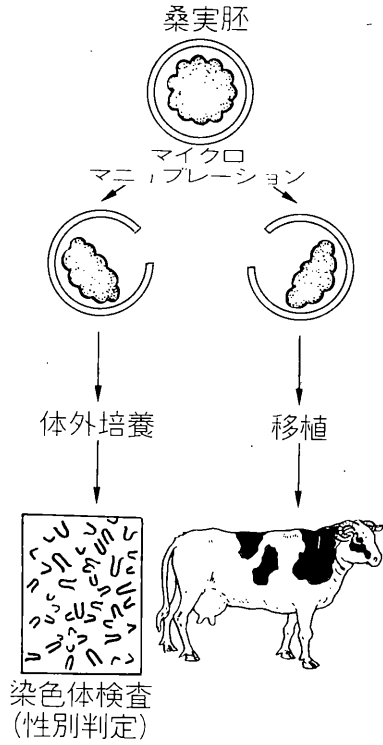
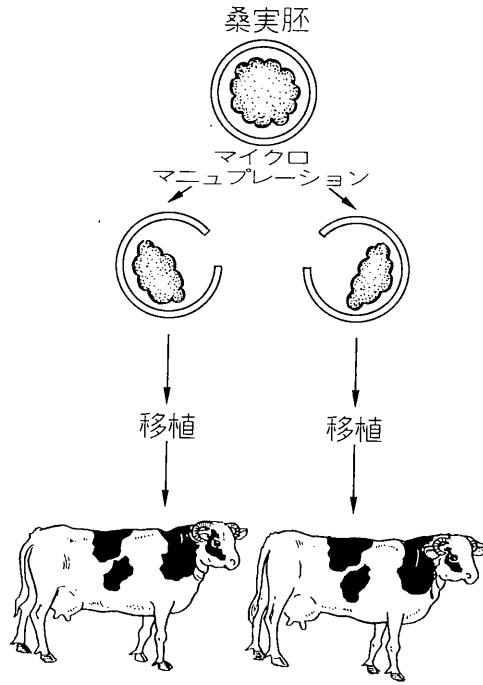


図11 受精卵の融合と体外培養。
受精卵の透明帯をたんぱく分解酵素で除去して、4個の受精卵(a)を融合させて1個の受精卵として発育させる(b)。

性別判定



1卵性双仔



時期をずらした
1卵性双仔

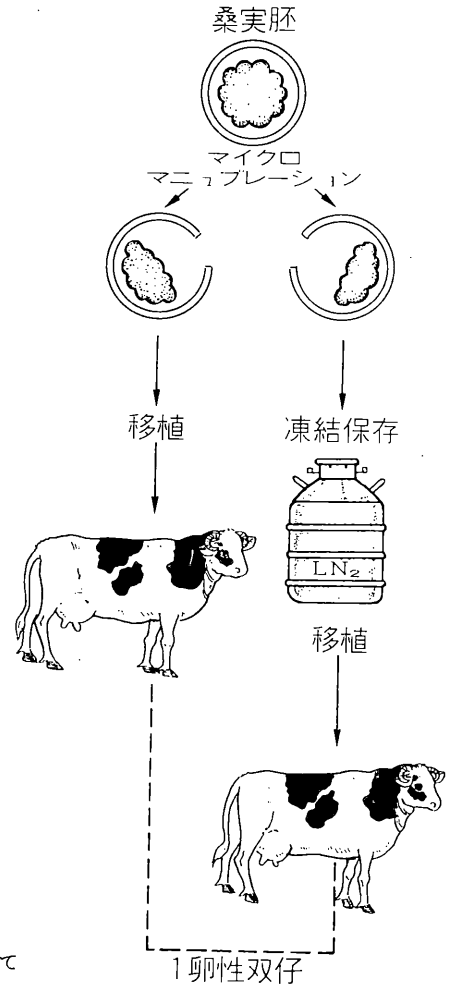


図10 牛受精卵の人為的分割によるいろいろな可能性について

牛頭数の増加に有効であり、受精卵移植と組み合わせることで次の2つの方法が研究されている。1つは普通に交配を行った雌牛にもう1個の受精卵を移植する方法、2つ目は発情時には授精を行わずに2個の受精卵を移植する方法である。農林水産省福島種畜牧場では、後者の方法で18頭のホルスタイン種に和牛の受精卵を2個ずつ移植し、そのうち10頭が妊娠し、最近分娩のあった6頭中5頭が双仔であったという。乳牛の場合は、異性双仔の雌仔はフリーマーチンと称する不妊症になる場合が多く問題である。

9. わが国で牛受精卵移植技術を採用するための模索

カナダ、アメリカではエリートカウ(優良雌牛)をDonorとして、スーパーサイア(優良雄牛)との間で計画的な交配を行って受精卵移植が盛んに行われている。このようにして受精卵移植を採用して優良牛を増産しても、それらの仔牛を販売できる乳牛および肉牛市場を国の内外に保有している。このような組み合わせから生まれた種雄牛や種雄牛候補がわが国に輸入されてくるものも少なくない。

自由経済で大切なことは、需要・供給のバランスであり、生産物の流通と販売マーケットの有無である。牛受精卵移植の生産物は優良仔牛であり、これらの優良仔牛を販売できる乳牛および肉牛市場を国の内外に保有しているか否かが非常に大切である。しかし、残念なことにわが国では農業全体、特に酪農界が経済的な低迷を続けており、仔牛の個体販売など牛市場が活発でないうえに、国外に対しては全くその販路を有していないのが現状である。さらに、人工授精事業もかなり統廃合されてきたために、優良な雄仔牛が生産されても種雄牛候補として買い上げられるチャンスは少なくなってきた。加えて、国内の人工授精所はカナダ・アメリカ両国から優良種雄牛や種雄牛候補の輸入を盛んに行っており、国内で生産された雄仔牛はますます利用されない傾向にある。牛の出産性比は、ほぼ50:50である。したがって、受精卵移植の場合も例外ではなく50%は雄仔牛が生まれてくることになるが、前述のようにわが国で

雄仔牛が利用されないのであれば、受精卵移植の効果は半減してしまうことになる。

それでは、なぜわが国では優良仔牛の個体販売の市場が活発ではなく、また、国外にもその販路を有しておらず、さらに、雄仔牛は種雄牛候補として活用されないのであろうか。

まず、わが国全体として農業・酪農界を発展させ、活力のある魅力のある産業にしなければならない。種々の補助金などの制度資金が、それを利用した酪農家に対して重い負担となり、経済的に身動きができなくなってきているために、受精卵移植のような新しい技術を取り入れようとする進取の気運が、酪農家の間に起きてこないといえれば残念なことである。

わが国が国外に牛のマーケットを持っていない理由にはいろいろなことが影響しているが、その中には、あまりにもカナダ、アメリカ模倣・追従型の改良計画や後代検定システムの立ち遅れなどをあげることができるのではなからうか。過去数10年にわたって、カナダ・アメリカから輸入された優良牛がわが国の畜牛の改良に果たした役割は計り知れない。しかし、いつまでもカナダ、アメリカの模倣と追従では、いつまでたってもわが国の酪農界は国際レベルに達することはできないであろう。いつかは追い付き、追い越さなければならない。そのためには、わが国の気候、風土に適し、しかも経済効率のよいわが国に適した高能力牛を作り出さなければならないのではなからうか。わが国独自で苦労と研究を重ね、わが国としての明確な改良目標を定めて、乳牛であれば「日本ホルスタイン種」を作るぐらいの意欲が必要と考えられる。カナダ、アメリカあるいはヨーロッパ諸国と比較して、わが国の気候一つをみても亜寒帯に近い北海道から、亜熱帯に近い九州まで、山地でも平地でも海岸地帯でも都市部でも一律にホルスタイン一辺倒はどういうものであろうか。

肉牛を例にとっても、和牛の場合はわが国独特な特殊事情、すなわち和牛の血統や生産地、複雑な牛肉の流通機構、牛肉の輸入問題、霜降り肉嗜好の消費者、輸入飼料や設備投資などからくるコスト高などが複雑に絡み合っている。それでもなおかつ、神戸牛とか松坂牛の牛肉は世界一流の牛

肉として、高級肉としての国際的な評価を受けていない。ここでわれわれ日本人はどんな牛肉を必要として、そのためにはどんな肉牛が必要かを考えてみるのが大切だと思う。

受精卵移植を行う上で大切なことは、わが国独自の改良目標に適合する優良雌牛 (Donor) の選抜と、安価で健康な借り腹牛 (Recipient) の確保である。各酪農家は自分の経営を徹底的に究明し、生産コストの低減と経営体質を強化して国際競争力をつけ、そのような経営改善の中で受精卵移植を採り入れて、短期間に優良牛の頭数を増加させるような、少数精鋭主義で目標を達成することはできないであろうか。例えば、自分の牛舎内上位 10% の牛を Donor として優良な受精卵の供給に使い、下位の牛を Recipient に使う方法などで短期間に牛群を改良できればすばらしいと考える。

あとがき

畜産・獣医界では、長年にわたって人間に都合の良いように家畜の品種改良や高記録を生み出すための努力が払われてきた。家畜に対する受精卵移植は、無用となる運命の無数の卵子を積極的に活用し、経済効果を高めようとする増殖・改良行為である。家畜は経済動物であり、受精卵移植の目的や意義づけは人医界とは異なっている。しかし、家畜も同じ哺乳動物であり、生命を有し、我々人間の生活に深くかかわっているのであるから、当然生命倫理に基づき、研究者あるいは獣医師としての良心を持って受精卵移植を行うべきであると考える。

文献

- 1) Brackett, B.G., Bousquet, D., Boice, M.L., Donawick, W.L., Evans, J.F.Z. & Dressel, M. A. 1982. Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biol. Reprod.* 27: 147-158.
- 2) Chang, M.C. 1959. Fertilization of rabbit ova in vitro. *Nature (Lond.)*. 184: 466-467.
- 3) 花田 章、包 旭日干. 1984. ヤギ卵子の体外受精と 2 - 細胞期卵割卵の移植による受胎例. 第 75 回日本畜産学会. 123.
- 4) Kanagawa, H. 1979. One to two day preservations of bovin embryos. *Jpn. J. Vet. Res.* 28: 1-6.
- 5) 金川弘司、高橋芳幸、井上忠恕、福井 豊. 1984. 牛の受精卵移植. 金川弘司編著. 近代出版. 東京. 1-200.
- 6) Polge, C. & Rowson, L.E.A. 1952. Long term storage of bull semen frozen at very low temperatures (-79°C). 2nd Internat. Congr. Physiol. Path. Anim. Reprod. & AI. Copenhagen, 3: 90.
- 7) Stepoe, P.C. & Edwards, R.G. 1978. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet*. 2: 366.
- 8) Sugie, T. 1965. Successful transfer of a fertilized bovine egg by non-surgical techniques. *J. Reprod. Fertil.* 10: 197-201.
- 9) Whittingham, D.G., Leibo, S.P. & Mazur, P. 1972. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C. *Science (Wash. D.C.)*. 178: 411-414.
- 10) Willadsen, S.M. 1979. A method for culture of micromanipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins. *Nature (Lond.)*. 277: 298.