

マウス体外受精における前培養及び受精時の
精子濃度が精子の卵子への侵入に及ぼす影響

町田隆彦・上田修二・青木晋平
(農学部 畜産研究室)

Effects of Sperm Concentration of Preincubation and
Insemination on the Sperm Penetration in to Mouse eggs
for Fertilization *in vitro*

Takahiko MACHIDA, Shuji UEDA, Shimpei AOKI
Laboratory of Zootechnical Science, Faculty of Agriculture.

Abstract: Fertilization *in vitro* of mouse spermatozoa was studied by examining the rate of penetration of eggs by various sperm concentration of preincubation and insemination.

Sperms recovered from cauda epididymis of adult males mouse of ICR strain were suspended in a m-KRB solution supplemented with glucose, Na-pyruvate, bovine albumin and antibiotics and preincubated at 37°C under 5% CO₂ in air for one hour. Immature female mice (21-28 days) of ICR strain were superovulated with PMSG and HCG. Eggs recovered from ampulla of oviduct at 15-16 hours after injection of HCG were inseminated.

Only 7 to 34%, 6 to 23% of the superovulated eggs from immature mice were penetrated when the preincubated sperm concentration was 25 to 40 × 10⁶/ml and inseminated sperm concentration was 0.1 to 0.9 × 10⁶/ml and 0.01 to 0.09 × 10⁶/ml. The rate of eggs penetrated was 65 to 98% and 88 to 96% when the preincubated sperm concentration was 10 to 20 × 10⁶/ml and the inseminated that was 0.1 to 0.9 × 10⁶/ml and 0.01 to 0.09 × 10⁶/ml. At the preincubated sperm concentration of 0.1 to 0.9 × 10⁶/ml when the inseminated sperm concentration of 0.1 to 0.9 and 0.01 to 0.09 × 10⁶/ml, 19 to 74% and 34 to 94% of the eggs from immature mice were penetrated.

1,2

近年、精子の受精能獲得の機序、^{1,2} 卵子保存の術式などが明らかにされるに至って、哺乳動物の体外受精の研究が急速に進展し、実験動物、^{3~11)} 家畜、^{12~14)} で数多くの成功例が報告されている。さらに1978年には、ヒトにおいて試験ベイビーの第1号の誕生をみて以来、¹⁵⁾ 現在においては、不妊症治療の1手段として実用化されるまでに至った。しかし、体外受精の安定した成績を得るための方法は多岐に亘り、未だ詳細な検討を要する問題も数多く存在する。その1つとして、精子が受精能を獲得するための前培養時ならびに、体外受精時の最適精子濃度に関する研究は、比較的少なく、十分に言及されていない。

そこで、本実験では、マウスの体外受精における精子濃度を、前培養時0.1~40 × 10⁶/ml、授精時0.01~20 × 10⁶/mlの広い範囲で設定し、各濃度試験区の精子の卵への侵入率、侵入過程などについて経時的に検討した。

材料及び方法

実験材料としては、ICR系マウスを、人工明暗(12:12時間)、室温20°Cの条件下で、不断給飼で飼育したものを供試した。精子の採取は、成熟雄マウスの精巣上体尾部の精子塊を培養シャーレ(35×10mm)のパラフィンオイル内の培養液中(修正 Krebs-Ringer Bicarbonate Buffer KRB 0.4ml)に取り込み、Table 1 に示す前培養各精子濃度にそれぞれ調整し、37°Cの炭酸ガス培養器(5% CO₂, 95% air)に1時間静置して前培養した。なお、前培養時の精子濃度区として、高濃度 I 区 (25~40 × 10⁶/ml)、高濃度 II 区 (10~20 × 10⁶/ml)、中濃度区 (0.1~0.9 × 10⁶/ml)の3区、授精時の濃度区として、高濃度区 (10~20 × 10⁶/ml)、中濃度区 (0.1~0.9 × 10⁶/ml)、低濃度区 (0.01~0.09 × 10⁶/ml)の3区を設けた。(Table 1.) 卵子の採取は、21~28日令の幼若雌マウスに5~8iuのPMSG(セ

Table. 1 Sperm concentration of preincubation and insemination

Sperm concentration of preincubation (× 10 ⁶ /ml)	Sperm concentration of insemination (× 10 ⁶ /ml)	No. of experiment
High sperm concentration(I) 25 - 40	Medium sperm concentration 0.1 - 0.9	1
	Low sperm concentration 0.01 - 0.09	2
High sperm concentration(II) 10 - 20	High sperm concentration 10 - 20	3
	Medium sperm concentration 0.1 - 0.9	4
	Low sperm concentration 0.01 - 0.09	5
Medium sperm concentration 0.1 - 0.9	Medium sperm concentration 0.1 - 0.9	6
	Low sperm concentration 0.01 - 0.09	7

ロトロピン：帝国臓器)を腹腔内に注射し、さらに48~50時間後にHCG 5iu (プベローゲン：三共)を同様に注射して、過排卵を誘起した。HCG注射後15~16時間目に供試雌マウスの卵管を摘出し、前記の前培養を終了した培養シャーレ内の精子懸濁液中に卵子を取り込み受精させた。受精後5時間培養した卵子を経時的に取り出し、培養液で2度洗浄したのち、スライドガラス上に移し、中性ホルマリンで固定後、0.25%の酢酸ラクモイドで染色して、ノマルスキー微分干渉装置付顕微鏡で精子の卵子への侵入状態を観察した。精子侵入卵を、次の4期に分類した。Stage I：精子が透明帯を通過して囲卵腔に止まっているか、あるいは、卵原形質膜に接している卵子。Stage II：精子

が卵細胞質内にあり、卵原形質膜と精子の先体後部原形質膜の融合の結果、後頭部の核質の拡散が始まった卵子。Stage III: 核質の拡散が、精子頭部の全域に渡り、精子核が完全に膨潤している卵子。Stage IV: 雄性前核の核小体と、精子の尾部が確認できる卵子。

結果及び考察

1. 高濃度 I ($25 \sim 40 \times 10^6/ml$) で前培養した精子による成績 (Table 2)

この高濃度 I の前培養精子を、 $0.1 \sim 0.9 \times 10^6/ml$ (中濃度) に希釈して、卵子と受精させた区 (高 I - 中区) においては、受精後 1 時間目に初めて精子侵入卵が観察された (7%)。3 時間目に 32% に増加したが、以後、侵入率は増加せず、受精後 5 時間目においても 33% と低率であった。卵子内

Table. 2 Temporal relationship between penetration and transformation of sperm head in mouse eggs in vitro

Sperm concentration ($\times 10^6/ml$)		Incubation period (hr)	No. of eggs examined	b. Total (%)	No. of eggs penetrated			
Preincubation	Insemination				Stage (%) a.			
					I	II	III	IV
	0.1 - 0.9	1	83	6 (7)	4 (67)	2 (33)		
		2	117	8 (7)	5 (63)	3 (38)		
		3	109	35 (32)	14 (40)	2 (6)	13 (37)	6 (17)
		4	77	26 (34)	1 (4)	1 (4)	2 (8)	22 (85)
		5	87	29 (33)	1 (3)	4 (14)	9 (31)	15 (52)
25 - 40	0.01 - 0.09	1	63	4 (6)	4 (100)			
		2	85	12 (14)	4 (33)	5 (42)	3 (25)	9 (50)
		3	92	18 (20)	4 (22)	2 (11)	3 (17)	7 (37)
		4	82	19 (23)	7 (37)	5 (26)	2 (17)	
		5	95	12 (13)	10 (83)			

- a. Stage I: Eggs with intact sperm head in perivitelline space
 Stage II: Eggs with partially enlarged sperm head in vitellus
 Stage III: Eggs with fully enlarged sperm head in vitellus
 Stage IV: Eggs with male pronucleus

b. Percentage of eggs to the total number of eggs penetrated

に侵入した精子頭部の形態的变化を経時的に観察すると、受精後 1 時間目に Stage I と、Stage II の侵入卵が同時に観察された。また、精子頭部が膨化した Stage III の卵子は受精後 3 時間目に観察された。

高濃度 I での前培養精子液を、 $0.01 \sim 0.09 \times 10^6/ml$ (低濃度) に希釈して体外受精した区 (高 I - 低区) においても授精後 1 時間で精子侵入卵が観察されたが (6%)、4 時間目で 23% と著しく低率であった。侵入した精子頭部の経時的变化も、前区に比べてさらに遅れ、Stage III の精子は 2 ~ 3 時間目、Stage IV は 3 ~ 5 時間目に観察された。以上のように、高濃度 I 前培養精子を、授精時に中、低濃度に希釈しても精子侵入率は、それぞれ 6 ~ 34%、6 ~ 23% の低率であり、とくに、この区においては、培養 3 時間以降、経時的に精子侵入率が高まらなかった。NIWA & CHANG¹⁰⁾ ら

は、ラット精子を高濃度で前培養した場合、培養中に高濃度の精子が受精能を獲得して代謝能が旺盛になり¹⁷⁾、そのため培養液中の栄養源の枯渇に起因して、精子侵入率が低率となると報告している。また、精子の希釈によって¹⁸⁻²¹⁾ 精子の無機イオン、とくに、 K^+ の漏出が精子の受精能に悪影響を与えることが報告されているが²²⁻²⁵⁾ 本実験区においても、高濃度前培養や、受精時高希釈倍率の条件が、侵入率の低下を齎したものであろう。

2. 高濃度Ⅱ ($10\sim 20\times 10^6/ml$) で前培養した精子による成績 (Table 3.)

この前培養精子液の授精時の精子濃度区として $10\sim 20\times 10^6/ml$ (高濃度区)、 $0.1\sim 0.9\times 10^6/ml$ (中濃度区)、 $0.01\sim 0.09\times 10^6/ml$ (低濃度区)の3区を設けた。高濃度受精区(高Ⅱ-高区)は、365個の供試卵のうち僅か2個(0.5%)の精子侵入卵が観察されたに過ぎなかった。中濃度受精区(高Ⅱ-中区)は、精子侵入卵が授精後1時間に観察され、その侵入率は65%であった。さらに2時間目で91%と上昇し、5時間目で98%の侵入率が得られた。侵入精子頭部の形態的变化は、受精後1時間で、StageⅠの卵子が57%、StageⅡが34%、さらにStageⅢまで進行した卵も9%が同時に観察され、

Table. 3 Temporal relationship between sperm penetration and transformation of sperm head in mouse eggs in vitro

Sperm concentration ($\times 10^6/ml$)		Incubation period (hr)	No. of eggs examined	b. Total (%)	No. of eggs penetrated			
Preincubation	Insemination				Stage (%) a.			
					I	II	III	IV
		1	70	0				
		2	50	0				
	10 - 20	3	84	2	1	1		
		4	49	0				
		5	112	0				
		1	68	44(65)	25(57)	15(34)	4(9)	
		2	91	83(91)	24(29)	16(18)	43(52)	
10 - 20	0.1 - 0.9	3	101	88(87)	6(7)	6(7)	65(74)	11(13)
		4	78	66(85)	8(12)	2(3)	19(29)	37(56)
		5	62	61(98)	1(2)	6(10)	5(8)	49(80)
		1	80	71(89)	13(18)	8(11)	50(70)	
		2	80	75(93)	4(5)	7(9)	64(85)	
	0.01 - 0.09	3	77	68(88)	4(6)	4(6)	53(78)	7(10)
		4	97	93(96)	8(9)	2(2)	15(16)	68(73)
		5	75	71(95)	10(14)		3(4)	58(82)

a. Stage I : Eggs with intact sperm head in perivitelline space

Stage II : Eggs with partially enlarged sperm head in vitellus

Stage III : Eggs with fully enlarged sperm head in vitellus

Stage IV : Eggs with mole pronucleus

b. Percentage of eggs to the total number of eggs penetrated

卵細胞質内に侵入した精子頭部の膨化は、短時間で後頭部から頭部全域にわたって進行することが明らかになった。StageⅢの卵の割合が最高となったのは、受精後3時間目(74%)であった。Stage

Ⅲの卵子の割合が、精子侵入卵の50%を越えてから、Stage IVの割合が50%に達するのに2時間を要した。すなわち、精子頭部が膨化してから雄性前核が形成されるまで2時間を要する。

10-20×10⁶ ml で前培養した精子を、0.01-0.09×10⁶ ml の低濃度に希釈して(高Ⅱ-低区)受精した区においては、培養後1時間目には全て卵子は卵丘細胞に取り巻かれていたが、供試卵80のうち、71個に精子の侵入がみられた。(89%) 授精後2時間目で侵入率は90%を越え、全期を通じて本実験の試験区のうち最も高い精子侵入率が得られた。(88-96%) 頭部形態の経時的变化も、授精後1時間でStage I の卵が18%、Stage II が11%、Stage III が70%が観察され、この時期に精子侵入卵のうち80%が卵子の原形質膜を精子が通過していたことになる。Stage III の卵子は、授精後2時間目に全侵入卵のうち85%の最高の割合を占めた。しかし、授精後1時間でStage III の卵が70%に達したにもかかわらず、Stage IVの卵子が初めて観察されたのは、授精後3時間目であり、その割合も10%に過ぎなかった。その後、1時間以内に50%を越え、4時間目で73%となった。この高Ⅱ-低区は、精子膨化のStage IIIまでは早く推移したが、Stage IIIの割合が全精子侵入卵の50%を占めてから(授精後1時間以内) Stage IVの卵子の割合が50%を越えるまで(授精後3~4時間)2時間以上要し、前核形成は高Ⅱ-中区と同時期であった。このことから精子頭部の膨化から前核形成への過程は一方的に精子側だけからの成熟によるのではなく、卵子側からの働きかけが進行に関与するように考えられる。

以上、本試験区の高Ⅱ-中区と、高Ⅱ-低区において、授精後1時間目に65%と89%の精子侵入卵が認められたことは、精子の受精能獲得のための前培養時の精子濃度としては10-20×10⁶ ml が適当であり、前培養時間も1時間で十分に精子の受精能を獲得させ得ることが確認された。しかし、この濃度は授精時の精子濃度としては不適当であった。この要因として授精時の精子から放出された高濃度のヒアルロニダーゼや、アクロシンの濃度が培養液中に高まることによって透明帯の精子受容体に変化して、精子が透明帯に結合し侵入できなくなることが考えられる。また、精漿中にトリプシン阻害物質が存在することが報告されており、²⁶⁻²⁸ 高濃度の精子液中にこの物質が多く、先体内のトリプシン類似酵素を不活化することも推察される。この一連のInhibitorの存在は、卵子の多精子侵入防止機構の一つといえよう。また、中濃度授精区が低濃度授精区に比べて、Stage IIIまでの侵入時期が稍遅延したのは、中濃度授精区は受精能獲得精子や、先体反応を起こした精子が低濃度授精区よりも多く存在することにより、これら精子に対する卵子の反応に差が生じ、HARTMAN & GWATKIN²⁹が提唱するB1結合からB2結合のタイムラグが遅延したことに起因することが考えられる。

次に、本試験で安定した精子侵入率が得られた高Ⅱ-中区と、高Ⅱ-低区について、多精子受精の発生と、卵子に侵入した精子数を比較した。多精子受精卵の発生は、Table 4に示した通りである。中濃度授精区(0.1-0.9×10⁶ ml)では、多精子受精卵は受精後2時間目に7%、3時間目に13%、観察されたが、以後増加しなかった。低濃度授精区(0.01-0.09×10⁶ ml)においても、受精後2時間目に15%の発生がみられたが、他の区は10%以内の発生率であった。多精子受精卵を、卵黄内に侵入した精子数で比較すると、中濃度授精区はDi-spermyが培養後2~5時間目、Try-spermyは3、5時間目、さらにTetra-spermyは5時間目に観察された。また、低濃度授精区では、殆んどがDi-spermyで、Try-spermyが1例認められたに過ぎなかった。一般に哺乳動物の体外受精では多精子侵入卵の割合が高いことが知られている。とくに、マウスでは精子濃度の上昇とともに³⁰、また、培養後経時的³¹に多精子侵入卵が増加するという報告があるが、本実験の両授精濃度間では、その傾向は認められなかった。また両授精区の全供試卵に対する多精子受精卵の割合は、各々5.8%(24/414)と5.5%(21/382)であり、*in vivo*の発生率1%³⁰に比べて高率であった。体外受精卵は、*in vivo*での受精卵に比べて、透明帯反応が不十分であるため、卵胞腔内に侵入する精子が多くな

Table. 4 Monospermic and polyspermic fertilization of eggs inseminated with preincubated (1 hr) epididymal sperm ($10-20 \times 10^6/\text{ml}$)

Sperm concentration of insemination	Incubation period (hr)	No. of penetrated eggs	No. of eggs undergoing fertilization				
			Total (%)	Monospermic (%) ^a	Polyspermic (%) ^b		
					Di-	Tri-	Tetro-
$0.1 - 0.9 \times 10^6/\text{ml}$	1	54	22(41)	22(100)			
	2	90	60(67)	56(93)	4(7)		
	3	104	85(82)	74(87)	7(8)	4(5)	
	4	66	49(74)	46(94)	3(6)		
	5	100	68(68)	62(91)	2(3)	3(4)	1(1)
$0.01 - 0.09 \times 10^6/\text{ml}$	1	71	58(81)	54(93)	4(7)		
	2	75	71(94)	60(85)	10(14)	1(1)	
	3	68	64(94)	60(94)	4(6)		
	4	93	85(91)	83(98)	2(2)		
	5	75	71(99)	71(100)			

a. Percentage of eggs to the total number of eggs penetrated.

b. Percentage of eggs to the total number of eggs undergoing fertilization

Table. 5 Numbers of spermatozoa that penetrated or developed to pronuclei in an egg following insemination with preincubated (1hr) epididymal sperm ($10 - 20 \times 10^6/\text{ml}$)

Sperm concentration of insemination		1	2	3	4	5
		$0.1 - 0.9 \times 10^6/\text{ml}$	No. of spermatozoa in a penetrated egg	2.4	3.0	4.0
	No. of male pronuclei (or swollen sperm heads) in a egg under going fertilization	1.0	1.1	1.2	1.2	1.4
$0.01 - 0.09 \times 10^6/\text{ml}$	No. of spermatozoa in a penetrated egg	3.4	4.4	2.7	3.6	2.5
	No. of male pronuclei (or swollen sperm heads) in a egg under going fertilization	1.1	1.2	1.0	1.0	1.0

り、ひいては複数の精子が卵細胞質内に侵入する機会が増加することが考えられる。

卵子の透明帯を通過した精子数と、卵細胞質内に侵入した精子数はTable 5に示した通りである。

透明帯通過精子数は、両濃度受精区とも2~4匹の範囲であり、培養後経時的に増加しなかった。両区の平均は、3.0と3.3であった。IWAMATSU & CHANG³⁾は4.0、豊田³⁾は3.1であったと報告している。卵細胞質内侵入精子数は、両区の平均は、各々1.1と1.2であり、IWAMATSU³⁾の1.0の数値と近似した。これらの結果から、マウス卵は、透明帯反応は稍緩慢であるため、卵卵腔内に複数の精子が侵入するが、卵黄遮断機構は有効に働き、Polyspermyの発生を低率に抑えていることが示唆される。

3. 中濃度(0.1-0.9×10⁶/ml)で前培養した精子による成績 (Table 6.)

前培養時と同一の中濃度(0.1-0.9×10⁶/ml)で受精させた区は、受精後1時間目に精子侵入卵が観察されたが、19%の低率であり、以後、2時間目で58%、5時間には74%に上昇した。卵に侵入した精子頭部の経時間変化も、受精後1時間で、Stage II、IIIの卵が観察されたが、Stage IVの卵は4時間目にあらわれ、5時間で50%を越えた。また、前培養を終えた中濃度の精子液を0.01-0.09×10⁶/mlの低濃度に希釈して受精した卵では、受精後1時間で40%の卵に精子の侵入がみられ、5時間目では90%に達した。

以上、この区は前記の中濃度前培養区に比べて、培養初期の精子侵入率が低率であった。また、侵入精子の形態変化は、Stage IIは1時間目(15%)、Stage IIIは3時間目(4%)、Stage IVの精子は4時間目に観察された(11%)。前核形成がみられるStage IVの卵が50%を越えるのは、両区とも受精後5時間目であり、前項の高II-中、低区に比べて、約1時間遅延した。したがって、0.1-0.9×10⁶/mlの前培養区では、受精能獲得は前培養1時間では不十分であり、培養後漸次達成されたため、精子侵入Stageの遅れを生じる結果となった。

Table. 6 Temporal relationship between sperm penetration and transformation of sperm head in mouse eggs in vitro

Sperm concentration (×10 ⁶ /ml)		Incubation period (hr)	No. of eggs examined	b Total (%)	No. of eggs penetrated Stage (%) a			
Preincubation	Insemination				I	II	III	IV
0.1 - 0.9		1	74	14(19)	10(71)	2(14)	2(14)	
		2	86	50(58)	36(72)	12(24)	2()	
		3	58	33(57)	7(21)	14(42)	12(36)	
		4	75	53(71)	15(28)	15(28)	13(25)	10(19)
		5	69	51(74)	5(10)	8(16)	10(20)	27(53)
0.01 - 0.09		1	68	27(40)	23(85)	4(15)		
		2	85	29(34)	22(76)	7(24)		
		3	92	49(53)	28(57)	19(39)	2(4)	
		4	83	70(84)	45(64)	6(9)	11(16)	8(11)
		5	77	69(90)	5(7)	6(9)	15(22)	43(62)

- a. Stage I : Eggs with intact sperm head in perivitelline space
- Stage II : Eggs with partially enlarged sperm head in vitellus
- Stage III : Eggs with fully enlarged sperm head in vitellus
- Stage IV : Eggs with male pronucleus
- b. Percentage of eggs to the total number of eggs penetrated

要 約

マウスの体外受精における前培養および授精時の精子濃度が、精子の卵子への侵入過程について経時的に検討した。

ICR系成熟雄マウスの精巢上体から採取した精子を、前培養時 $0.1\sim 40\times 10^6/\text{ml}$ 、授精時 $0.01\sim 20\times 10^6/\text{ml}$ の各濃度に調整し、過排卵処理を施した未成熟雌マウスの卵子に体外受精して、受精初期の過程を経時的に観察した。

(1) 前培養 $25\sim 40\times 10^6/\text{ml}$ 、授精時 $0.1\sim 0.9\times 10^6/\text{ml}$ 、 $0.01\sim 0.09\times 10^6/\text{ml}$ の精子濃度2区の精子侵入率は、各々7~34%、6~23%と低率であった。

(2) 前培養 $10\sim 20\times 10^6/\text{ml}$ を同一の高濃度で受精すると、供試卵365個のうち、僅か2個の卵しか精子侵入が認められなかったが、 $0.1\sim 0.9\times 10^6/\text{ml}$ および $0.01\sim 0.09\times 10^6/\text{ml}$ に希釈して、授精すると、各々65~98%、88~96%の高い精子侵入率が得られた。

(3) 前培養濃度 $0.1\sim 0.9\times 10^6/\text{ml}$ の精子を、 $0.1\sim 0.9\times 10^6/\text{ml}$ あるいは $0.01\sim 0.09\times 10^6/\text{ml}$ の濃度に調整して授精した区の精子侵入率は、19~74%、34~94%であり、この両区は精子の卵子への侵入時期が稍遅延した。

引 用 文 献

- 1) AUSTIN, C. R. (1951) *Aust. J. sci. Res.*, B4, 581.
- 2) CHANG, M. C. (1951) *Nature*, 168, 697.
- 3) THIBAUT, C. & L. DAUZIER (1960) *C. R. Acad. Sci.*, 250, 1358.
- 4) YANAGIMACHI, R. & M. C. CHANG (1963) *Nature*, 200, 281.
- 5) WHITTIGHAM, D. G. (1968) *Nature*, 220, 592.
- 6) PICKWORTH, S. & M. C. CHANG. (1969) *J. Reprod. Fert.*, 19, 371.
- 7) MIYAMOTO, H. & M. C. CHANG. (1973) *Nature*, 241, 50., *Biol. Reprod.*, 9, 384.
- 8) YANAGIMACHI, R. (1972) *Anat. Rec.*, 174, 9.
- 9) YANAGIMACHI, R. & M. C. CHANG (1964) *J. exp. Zool.*, 156, 361.
- 10) HAMMER, C. E., L. L. JENNINGS & N. J. Sojka, (1970) *J. Reprod. Fert.*, 23, 477.
- 11) BIGGERS, J. D., W. K. WHITTEN & D. G. WHITTINGHAM (1971) *Methods in Mammalian Embryology* (ed. Daniel, J. C. Jr), p86., W. H. FREEMAN & Co.
- 12) HUNTER, R. H. F. (1974) *Anat. Rec.*, 178, 169.
- 13) TERVIT, H. R., D. G. WHITTINGHAM & L. E. A. ROWSON (1972) *J. Reprod. Fert.*, 30, 493.
- 14) STREENAN, J. (1970) *J. Agric. Sci.*, 75, 393.
- 15) STEPTOE, P. C. & R. G. EDWARDS. (1978) *Lancet*, 2, 366.
- 16) NIWA, K., M. C. CHANG (1974) *J. exp. Zool.*, 189, 353.
- 17) HAMNER, C. E., W. L. WILLIAMS (1963) *J. Reprod. Fert.*, 5, 143.
- 18) CHANG, M. C. (1946) *Science*, 104, 361.
- 19) CHENG, P. L., L. E. CASIDA & G. R. BARRETT (1947) *J. Anim. Sci.*, 6, 496.
- 20) EMMENS, C. W. & G. I. M. SWYER (1947) *Nature*, 160, 718.
- 21) MANN, T. & C. Lutwak-Mann (1948) *Biochem. J.*, 43, 266.
- 22) DOTT, H. M. & I. G. WHITE (1964) *J. Reprod. Fert.*, 7, 127.
- 23) WALES, R. G. & T. G. WHITE (1958) *J. Physiol.*, 142, 494.
- 24) WALES, R. G. & T. G. WHITE (1961) *Aust. J. Biol. Sci.*, 14, 637.
- 25) WALES, R. G. & T. G. WHITE (1963) *J. Reprod. Fert.*, 5, 67.
- 26) FRITZ, H., I. TRANTSCHOLD, H. HAENDLE & E. WERLE (1968) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 146, 400.
- 27) ZANEVELD, L. J. D., P. N. SRIVASTAVA & W. L. WILLIAMS (1970) *Proc. Soc. exp. Biol. M-*

ed., 133, 1172.

- 28) ZANEVELD, L. J. D., R. T. ROBERTSON, M. KESSLER & W. L. WILLIAMS(1971) J. Reprod. Fert., 25, 387.
- 29) HARTMANN, J. F. & R. B. L. GWATKIN.(1971) Nature, Lond., 234, 479.
- 30) 豊田裕 ; (1973) 家畜繁殖誌, 19(No. 5), 11.
- 31) IWAMATSU, T. & M. C. CHANG (1969) Nature, 224, 919.
- 32) 豊田裕, 横山峯介, 星条四郎(1971)家畜繁殖誌, 16, 152.

(昭和 58 年 6 月 28 日 受理)

(昭和 58 年 11 月 30 日 発行)

