

簡易融解法による牛凍結胚の野外移植

誌名	日本獣医師会雑誌 = Journal of the Japan Veterinary Medical Association
ISSN	04466454
著者	富永, 敬一郎 福島, 護之 秦谷, 豊
巻/号	43巻10号
掲載ページ	p. 734-739
発行年月	1990年10月

簡易融解法による牛凍結胚の野外移植

富永敬一郎* 福島護之* 泰谷 豊*

(平成2年1月22日受付・平成2年6月8日受理)

Field Trial of Bovine Frozen Embryo Transfer by Two-step Glycerol Dilution Method
KEIICHIRO TOMINAGA*, MORIYUKI FUKUSHIMA and YUTAKA HATAYA (* Hyogo Prefectural
Agricultural Institute, Befu, Kasai, Hyogo 679-01)

SUMMARY

In 1985 we reported the pregnancy rate of frozen embryo transfer by the method of two-step glycerol dilution with 0.6 M sucrose solution and BMOC-3 medium in a straw. The present experiment was carried out to estimate this method in field trials.

During the period from April, 1986 to March, 1989, 145 frozen-thawed embryos in total were produced from 25 donors by the method of two-step glycerol dilution in a straw and transferred to 145 recipients by 22 technicians in three districts of Hyogo Prefecture. Pregnancy rates were 55.3% (26/47) in district A, 34.4% (22/64) in district B and 35.3% (12/34) in district C, respectively. The technicians who transferred embryos to over 10 cows accounted for 66.7% in district A, which was larger than both 18.2% in district B and 12.5% in district C. When low quality embryos were transferred at the district with the lowest pregnancy rate, the pregnancy rate was higher in the embryos thawed in 0.6 M sucrose with isotonic salt concentration than in hypotonic 2/3 salt concentration.

Freezing damage occurred in the embryos graded as fair quality before freezing was examined morphologically at thawing, and after culture for a few hours. Freezing damage was less in the embryos thawed in 0.6 M sucrose with isotonic 3/3 salt concentration than hypotonic solution.

The result obtained at the present field trials suggested that the two-step glycerol dilution method is applicable to the field work of embryo transfer without decreasing the pregnancy rate.

—Key Words : frozen embryo, embryo transfer, glycerol dilution.

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 43, 734~739 (1990)

要 約

1986年4月～1989年3月までの3年間に兵庫県内の3地域で22名の技術者が移植現場で凍結胚を融解後、ストロー内でSucrose溶液と培養液で段階的にグリセリンを希釈し、ストローの外に取り出すことなく胚を移植した。その結果、3年間の通算受胎率はA地域で55.3% (26/47)、B地域で34.4% (22/64)、C地域で35.3% (12/34)であった。しかし、3地域を合計した成績では各年度とも40%以上の受胎率であった。なお、1人当たり10頭以上移植した技術者の比率はA地域で66.7% (2/3)、B地域で18.2% (2/11)、C地域で12.5% (1/8)となり、熟練した技術者の移植比率が高いA地域の受胎率が他の地域に比べて高かった。

また、凍結融解胚のグリセリン希釈液として利用するSucrose液の調整にあたり、Sucrose溶解液(塩類溶液)の浸透圧を等張培養液に比べて2/3に相当する低張液から等張へ高めることによって受胎率の低い地域で受胎率が高くなり、胚の発育性をみた培養試験でも凍結胚の障害が改善される傾向がみられた。

このストロー内2段階グリセリン希釈直接移植法は庭先融解が可能であり、融解移植操作を確実に実施することによって高い受胎率が得られる見通しがつき、牛凍結胚移植の広範な普及に役立つ方法であることが示された。

従来より、牛の凍結融解胚の移植時には、凍結保護物質として凍結操作時に添加されたグリセリン等を取り除くために、胚を含むストロー内の溶液を一旦シャーレに

出し、その溶液中の胚に適当な希釈溶液を加えるかあるいは段階的な濃度に調製された希釈溶液に順次胚を移して徐々にグリセリン等を除去することが原則とされており、その際の浸透圧の変化による胚への悪影響を考慮して段階的な方法がとられている。

次いで、移植のためには再びストロー内に培養液とともに胚を吸引しなければならない。

* 兵庫県立中央農業技術センター(加西市別府町南ノ岡甲1533)

Key Words : 凍結胚, 胚移植, グリセリン希釈

このような一連の操作はかなり複雑な作業が伴うことから、農家の庭先での凍結融解胚移植の普及に対して一つの障害ともなっている。

近年、融解した凍結胚のグリセリン希釈時に起こる浸透圧ショックから胚を保護する物質として Sucrose が利用されるようになった^{3,5)}。そのため、融解時に牛ではストロー内から胚を取り出すことなく、ストロー内に最初から収容されている Sucrose 溶液とグリセリンをストロー内で混合攪拌することでグリセリンを希釈する方法がとられるようになり、野外で簡易的な凍結胚移植が試みられている^{1, 4, 6-8, 11, 13, 16-18, 20, 21)}。しかし、LEIBO (1984)⁷⁾以外の報告は実験段階にとどまり、農家の庭先での長期間にわたる継続的な凍結融解胚の移植成績は報告されていない。また、ストロー内でグリセリン希釈のために使用される Sucrose 溶液を作る場合、塩類溶液が用いられるが(以下、「Sucrose 溶解液」と略す)、この Sucrose 溶解液の塩類濃度 (PBS²³⁾ の場合には NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂, KH₂PO₄, Na₂HPO₄, Sodium Pyruvate および Glucose の濃度、リンゲル氏液の場合には NaCl, KCl および CaCl₂ の濃度) を調整して体液の浸透圧と等張液³⁻⁷⁾あるいはそれより低張液^{1, 11, 16-18, 20, 21)}が作成されているが、溶解液の塩類濃度と移植成績との関係を検討した報告はみあたらない。

以上のような問題点を検討するため本試験を行った。

材料および方法

野外移植組織体制

1986年4月から1989年3月までの3年間に、メインセンターである中央農業技術センターにおいては供胚牛から胚を採取し凍結および保管を担当、サブセンターである3地域の家畜保健衛生所においてはメインセンターから凍結胚を受け取り保管し、農家で受胚牛が確保され

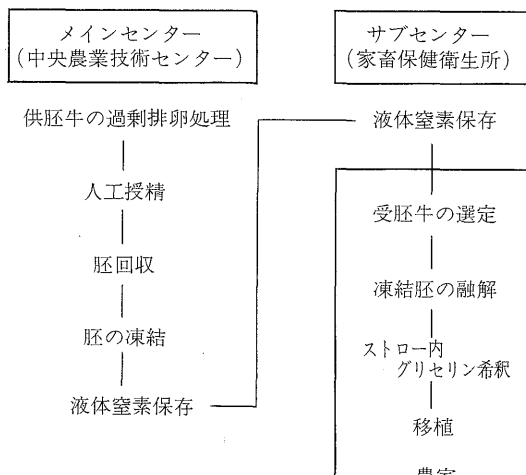


図1 牛凍結胚移植の野外移植システム

ると、現地に赴き胚を融解、ストロー内でグリセリンを希釈した後移植した(図1)。融解移植は3地域で22名の獣医師によって行われた。

供試胚

移植には、豚下垂体前葉性性腺刺激ホルモン (FSH)-プロスタグランジン法によって過剰排卵処理された24頭の3~10歳齢の黒毛和種経産牛からの発情後7日目の採卵によって得られた後期桑実期から拡大胚盤胞期に分類された胚を用いた。LINDER および WRIGHT (1983)⁹⁾が示した Degeneration, Poor, Fair, Good および Excellent の5段階等級に分類された胚のうち、Fair 等級以上の優良胚を供試した。

検討は2つの観点から行われ、その1つである移植試験では1個の Fair と144個の Good および Excellent 等級のもの、もう一方の培養試験では44個の Fair 等級の胚を用いた。

Sucrose 溶解用塩類溶液の調製

塩類濃度の異なる2種類の溶解液で Sucrose の0.6 M 液を作成するために胚の培養液と等浸透圧の等張液(以下、「3/3」と略す。)として、リンゲル氏液 (NaCl 8.60 g, KCl 0.30 g, CaCl₂ 0.33 g/l) と牛血清とを2:1で混合した液(以下、「リンゲル血清液」と略す。)と、胚の培養液に対して2/3の浸透圧の低張液(以下、「2/3」と略す。)として、リンゲル氏液の塩類成分を1/2に低下させた低張リンゲル氏液 (NaCl 4.30 g, KCl 0.15 g, CaCl₂ 0.17 g/l) と牛血清とを2:1で混合した液を作成し、それらの液で Sucrose を溶解した(以下、「0.6 M Sucrose 液」と略す。)

ストロー内への媒液ならびに胚の封入、凍結、融解およびグリセリン希釈

リンゲル血清液で保存した胚を3.3%、次いで6.6%のグリセリンを含むリンゲル血清液に移し変え各々の濃度で5分間浸漬した後、最後濃度の10%グリセリンを含むリンゲル血清液(以下、「10%グリセリン液」と略す。)で30分ないし1時間平衡した。これらの操作については37°Cに加温した状態で行った。いっぽう、融解時にストロー内でグリセリンを希釈するための、富永および福島 (1985)²⁰⁾の方法に従って図2のように0.25 ml ストロー内に綿栓側から BMOC-3 液¹⁵⁾、0.6 M Sucrose 液および10%グリセリン液の順に9:2:1の容量比率で空気を隔てて吸引し、これに対して10%グリセリン液で平衡処理中の胚をパスツールピペットを用いて1個ずつストロー内のグリセリン液層中に投入し、ゼラチンパウダーでストローを封じた。

次に、胚の凍結については、プログラムフリーザー(大阪酸素、FFP-190型)の冷却槽内に設けられた植水器から5 cm 下方の部位に胚を位置させるようにストローを垂直に併置し、温室から-5.0°Cまで1.0°C/分、

植水後、 -36°C まで $0.3^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 、 -160°C まで $60^{\circ}\text{C}/\text{分}$ で冷却し、 -160°C から液体窒素中に浸漬した。植水は過冷却を小さくして媒液の凍結点近くで強制的に氷晶形成させて、冷却中に胚細胞内の水を除くためのものであり胚の凍結に必須であるが今回の研究ではストローの固定部位の媒液が -2.3°C で 20 秒間自動的に氷晶形成さ

れ、冷却槽中でストローが -5.0°C で 10 分間保持されている間に氷晶が媒液中の下方に向かって胚の静置部位に伝わるようにして行った。

液体窒素中で胚を 2~659 日間保存した後、図 3 のように 37°C の恒温水槽中にストローを垂直に立て、胚の融解を行った。最初に、10% グリセリン液層と 0.6 M Sucrose 液層を混合した (第 1 希釈) 後、 37°C の恒温水槽中に綿栓を下にしてストローを垂直に立て、5 分間保持した。続いて全層を混合して (第 2 希釈)、第 1 希釈と同様にストローを垂直に立てて、5 分間保持した。

融解胚の生存性の検定

この実験には Fair 等級の胚を用い、凍結操作後融解したものについて凍結障害の有無を培養試験で検討した。その方法は前述のとおり Sucrose 溶解用の 2 種類の塩類溶液、すなわち培養液と浸透圧が等張 (3/3) のものと低張 (2/3) のものを用い、両者とも同じ 13 ロットの胚を前述の方法で凍結した。次いで、融解ではこれらを前述した要領でストロー内で 2 段階希釈後、ストローから胚をシャーレに取り出し BMOC-3 液で 3 回洗浄し同液に移し変え、 37°C 、5% CO_2 と 95% 空気の気相条件で 2~3 時間培養した。グリセリンを除去した胚の形態および培養後の胚の形態変化を凍結前の胚の形態と比較した。損傷がなく融解後も凍結前と同様の Fair 等級に分類される胚を (-)、損傷が軽く融解後に Poor 等級に分類される胚を (±)、重度の損傷を受け融解後 Degeneration 等級に分類される胚を (+) とし、障害の程度を 3 段階で判定した。

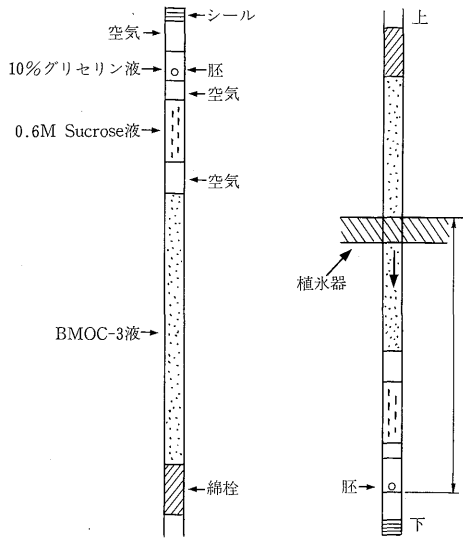


図 2 媒液のストロー内封入方法と植水器へのストローの固定方法

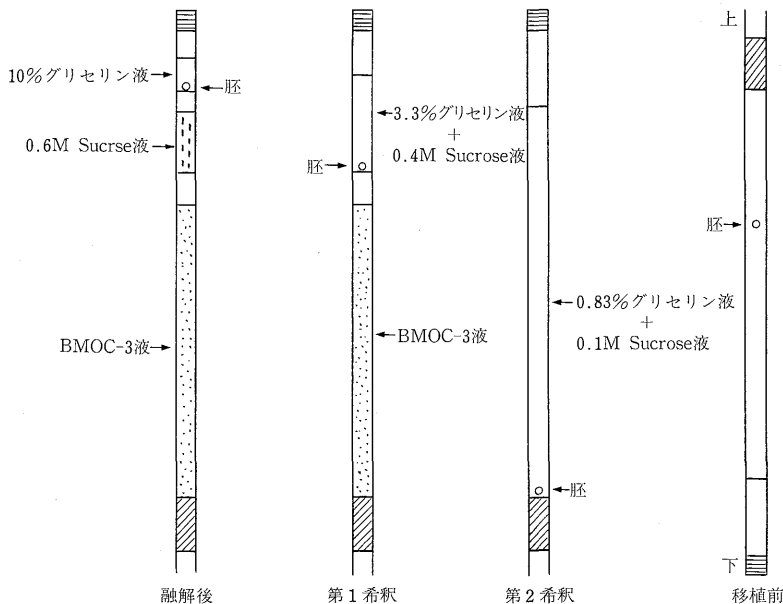


図 3 ストロー内でのグリセリン希釈方法

移 植

ストロー内で希釈した融解胚をストローから取り出すことなく、移植直前に移植器にセットした。胚を綿栓から離すための、ストローの上下を逆にした状態で移植器の先端が下方になるようにして1～2分間保持した。

1986年度にはカスー製0.25 ml ストロー用人工授精器を用い、1987と1988年度にはカスー製受精卵移植器を使用して胚を移植した。受胎牛として黒毛和種145頭を用い、供卵牛の発情との日差が±1.0日以内の受胎牛の黄体側子宮角に子宮頸管經由法によって非外科的に移植した。

成 績

表1に地域別移植成績を示した。すなわち、3地域で145頭の受胎牛に移植を行い、60頭の受胎例が得られた。A地域では47頭中26頭、B地域では64頭中22頭、C地域では34頭中12頭が受胎した。1人当たりの移植頭数が10頭を超えた技術者がB地域で11名中2名(18.2%)およびC地域8名中1名(12.5%)に比べ、

受胎率が高かったA地域では3名中2名(66.7%)と多かった。Sucrose溶解液の塩類濃度別ではその適用例数が年度によってまちまちであるが、主として1986～1987年度には2/3が多く、それ以後1988年度にかけては3/3で実施されたものが多かった。3年間の合計では2/3が39.0%、3/3が44.4%と塩類濃度が等張である方が受胎率が高くなる傾向が認められた。しかし、地域別にみた場合、受胎率が高かったA地域ではこの傾向ははっきりしなかった。

表2に凍結前の胚の品質と受胎率との関係を示した。Excellent等級の胚では42.9%、Good等級の胚では40.9%の受胎率を示しほとんど違いはみられなかった。Sucrose溶解液の塩類濃度との関係ではExcellent等級の胚で受胎率に差はみられないが、Good等級の胚ではBおよびC地域で塩類濃度2/3に比べ3/3での希釈胚の受胎率が高い傾向がみられた(38.2 vs 44.7, 30.8 vs 42.9%)。

表3に胚の発育ステージ別移植成績を示した。発育ステージの進行経過とともに受胎率がわずかに低下し、括

表1 ストロー内2段階グリセリン希釈直接移植法の実施年度と地域別移植成績

地 域	塩 類 濃 度	実 施 年 度			合 計
		1986	1987	1988	
A	2/3	8/15(53.3)*	9/13(69.2)	0/1(0)	17/29(58.6)
	3/3	0(-)	0/1(0)	9/17(52.9)	9/18(50.0)
	小 計	8/15(53.3)	9/14(64.3)	9/18(50.0)	26/47(55.3)
B	2/3	8/22(36.4)	2/11(18.2)	0/3(0)	10/36(27.8)
	3/3	0(-)	5/9(55.6)	7/19(36.8)	12/28(42.9)
	小 計	8/22(36.4)	7/20(35.0)	7/22(31.8)	22/64(34.4)
C	2/3	3/11(27.3)	2/6(33.3)	0(-)	5/17(29.4)
	3/3	0(-)	3/11(27.3)	4/6(66.7)	7/17(41.2)
	小 計	3/11(27.3)	5/17(29.4)	4/6(66.7)	12/34(35.3)
合 計	2/3	19/48(40.0)	13/30(43.3)	0/4(0)	32/82(39.0)
	3/3	0(-)	8/21(38.1)	20/42(47.6)	28/63(44.4)
	合 計	19/48(40.0)	21/51(41.2)	20/46(43.5)	60/145(41.4)

* 受胎頭数/移植頭数 (受胎率)

表2 ストロー内2段階グリセリン希釈直接移植法による胚の品質別移植成績

凍結前の 胚の品質	塩 類 濃 度	実 施 地 域			Total
		A	B	C	
Excellent	2/3	3/5(60.0)*	2/5(40.0)	1/4(25.0)	6/14(42.9)
	3/3	2/4(50.0)	4/8(50.0)	0/2(0)	6/14(42.9)
	小 計	5/9(55.6)	6/13(46.2)	1/6(16.7)	12/28(42.9)
Good	2/3	14/24(58.3)	8/31(25.8)	4/13(30.8)	26/68(38.2)
	3/3	7/14(50.0)	8/20(40.0)	6/14(42.9)	21/47(44.7)
	小 計	21/38(55.3)	16/51(31.4)	10/27(37.0)	47/115(40.9)
Fair	3/3	0(-)	0(-)	1/1(100)	1/1(100)
合 計	2/3	17/29(58.6)	10/36(27.8)	5/17(29.4)	32/82(39.0)
	3/3	9/18(50.0)	12/28(42.9)	7/17(41.2)	28/63(44.4)
	合 計	26/47(55.3)	22/64(34.4)	12/34(35.3)	60/145(41.4)

* 受胎頭数/移植頭数 (受胎率)

表3 ストロー内2段階グリセリン希釈直接移植法による胚の発育ステージ別移植成績

胚の発育ステージ	塩類濃度	受胎頭数 移植頭数	(率)
後期桑実期	2/3	2/6	(33.3)
	3/3	9/19	(47.4)
	小計	11/25	(44.0)
初期胚盤胞期	2/3	20/52	(38.5)
	3/3	15/31	(48.4)
	小計	35/83	(42.2)
胚盤胞期	2/3	10/24	(41.7)
	3/3	3/9	(33.3)
	小計	13/33	(39.4)
拡大胚盤胞期	3/3	1/4	(25.0)
合計		60/145	(41.4)

表4 Sucrose 溶解液の塩類濃度がFair等級胚の凍結障害に及ぼす影響

塩類濃度	発育ステージ	胚の障害の程度			損傷胚数 (率)
		(-)	(±)	(+)	
2/3	LM*	3	1	2	3/6(50.0)
	EB	13	3	5	8/21(38.1)
	小計	16(59.3)	4(14.8)	7(25.9)	11/27(40.7)
3/3	LM	6	1	1	2/8(25.0)
	EB	7	0	2	2/9(22.2)
	小計	13(76.5)	1(5.9)	3(17.6)	4/17(23.5)
合計		29(65.9)	5(11.4)	10(22.7)	15/44(34.1)

* LM: 後期桑実期, EB: 初期胚盤胞期

大胚盤胞期ではその低下が著しかった。Sucrose 液の塩類濃度と受胎率との関係についてみると後期桑実期および初期胚盤胞期では3/3が2/3より良く(48.0 vs 37.9%)、胚盤胞期では2/3が3/3より良い成績(41.8 vs 33.3%)であった。

表4にFair等級の胚の培養成績を示した。発育ステージと凍結障害との間に一定の関係はみられなかったが、塩類濃度では2/3が3/3より(±)と(+)程度の凍結障害を受けた損傷胚の比率が高かった(40.7 vs 23.5%)。

考 察

凍結融解胚のストロー内2段階グリセリン希釈直接移植法を用い農家段階で3年間にわたり牛胚移植を実施し、この庭先融解法による凍結胚移植の普及性を検討した。併せて凍結融解胚の生存および受胎成績に対して影響を与える主な要因として、融解時、グリセリンを希釈するためのSucrose液を調整する場合に用いる溶解液の塩類濃度についても検討を加えた。

凍結胚の輸送および移植は極めてスムーズに行われ、この方法の普及性が高いことが示された。3地域の22

名の術者により移植が行われ、地域別では3年間で34.4~55.3%の範囲の平均受胎率が得られ、移植者を限定し経験年数の長い術者のいるA地域で高かった。受胎率に影響する要因として術者のグリセリン希釈や胚注入技術のほか、多くのことが考えられるが、本法のようにストロー内でグリセリン希釈を行う場合にはストロー内での媒液の混合技術が大きな要因となる。LEIBO(1983-B)⁶⁾はOne step methodのような1段階でグリセリンを希釈する方法で移植した場合、融解者によって受胎率が22~41%と大きな差がみられたことを報告した。今後、ストロー内でのグリセリン希釈技術を斉一化することによって、受胎率をさらに向上できるものと思われる。

MASSIPら(1982)¹⁰⁾およびKENNEDYら(1983)²⁾は凍結融解胚の生存性が凍結前の胚の品質に大きく影響されることを報告したが、今回の研究ではGood等級以上の胚を供試したため胚の品質の良否は受胎率に影響しなかったものと思われる。

発育ステージと受胎率の関係では後期桑実期から初期胚盤胞期で安定した受胎率が得られたが、胚盤胞から拡大胚盤胞で受胎率が低下する傾向がみられた。NIEMANNら(1982)¹²⁾は凍結胚の融解後のグリセリン希釈において、1.0Mグリセリンと0.5M Sucroseを含むPBS²³⁾液、次に0.5M SucroseのみのPBS液の順に希釈し、胚盤胞期の受胎率が後期桑実期より高かったことを報告し、KENNEDYら(1983)²⁾は6段階グリセリン希釈法を用いた場合、日齢にあった発育をした胚の耐凍性が高く、後期桑実胚と初期胚盤胞が胚盤胞より培養による生存率がやや高かったことを示した。また、WRIGHT(1985)²⁴⁾は6段階でグリセリンを除去し、拡大胚盤胞期が後期桑実期~胚盤胞期より受胎率が高いことを報告し、LEIBO(1983-B)⁶⁾はOne step methodの場合に発育ステージと受胎率とに一定の関係を認めていない。このような報告者による違いは発育ステージと受胎率との関係を検討する場合には、凍結方法や希釈方法を一定にして比較する必要があることを示している。しかし、浸透圧衝撃が比較的強く細胞内外へのイオンの移動も大きいSucroseを使った希釈法では、本実験と同様に胞胚腔がない後期桑実期から、あっても小さい初期胚盤胞期の胚の抵抗性が強い傾向がみられている⁸⁾。

Sucrose濃度を0.6Mとした今回の研究において、Sucrose溶解液の塩類濃度が胚の培養液の浸透圧と等張である方がBおよびC地域で受胎率が高くなる傾向が認められたが、受胎率が高かったA地域ではこの傾向はみられなかった。また、BおよびC地域でSucrose溶解液の塩類濃度を等張液の2/3に低下させた時、Good等級で受胎率が低下し、Fair等級の胚の培養試験でも塩類濃度を等張にした方が凍結胚に対する障害が小さくなった。

一般に、Sucrose 液は培養液で溶解し調整されている³⁻⁷⁾が、RENARD ら (1982)¹³⁾は Sucrose 濃度を 0.25 M とした時には通常の塩類濃度で牛胚の発育率が高いが、1.0 M では溶解液の塩類濃度を 1/4 に低下させた時に胚の生存率が高くなることを認めた。鈴木らは 20% 血清を含む 2 次蒸留水で 10% (0.3 M) 濃度の Sucrose を溶解し、この液で溶解胚のグリセリン希釈を行い、溶解液の塩類濃度を低下させて希釈のための Sucrose 液を体液の浸透圧に近づけるとマウス胚で高い生存率が得られ¹⁶⁾、牛胚でも高い生存率と受胎率が得られたことを報告した^{16,17)}。また、高野ら (1987)¹⁹⁾は凍結融解胚について、鈴木ら¹⁶⁻¹⁸⁾の Sucrose を 2 次蒸留水で 10% に溶解した液と等張培養液で溶解した同濃度の Sucrose 液とを比較し、牛胚の生存性に差を認めていない。いっぽう、富永ら (1987)²²⁾は凍結融解マウス胚の Sucrose 溶液を用いた 2 段階グリセリン希釈では Sucrose が 1.0 M の高濃度の時には塩類濃度を等張培養液の 1/3 に低下させると 2/3、あるいは等張塩類濃度を用いた時よりも胚の生存率が向上したが、0.2~0.4 M の低濃度 Sucrose では塩類濃度を等張液の 2/3~1/3 に低下させると等張液を用いた時よりも胚の生存率が低下することを認めた。今回の研究では使用した Sucrose が 0.6 M であったにもかかわらず、ストロー内のグリセリンを希釈したことによって 0.4 M の濃度に低下したと思われる、マウス胚の実験と同じ様な影響が牛胚でもみられたことが考えられる。すなわち、塩類濃度が低いとそれだけ細胞内外の浸透圧差が大きくなり、融解胚に対する希釈時の傷害性を大きくしたことが品質の低い胚あるいは移植技術の未熟な地域で受胎率の低下を招いたものと考えられる。

一般に、Sucrose は分子量が大きいため細胞不透過性のため、融解胚のグリセリン希釈において浸透圧差による細胞内への吸水を抑制して胚細胞の膨化破壊を防ぐことができると考えられている^{7,14)}。1.0 M のような高い Sucrose 濃度の時には、胚の電解質濃度を低下させるために溶解液の塩類濃度を等張より下げることが有効であるが^{13,22)}、0.2~0.4 M のような低い Sucrose 濃度の場合には胚細胞膜の恒常性維持に等張液に近い塩類濃度が必要であると考えられる。このように、胚細胞内外の浸透圧が機械的な抵抗力の限界を越えないように、Sucrose 濃度とその溶解液の塩類濃度を調整して Sucrose 液の浸透圧を考慮する必要があることが示唆されたが、融解胚のグリセリン希釈における Sucrose と塩類濃度の組合せと胚の生存性との相互関係を明確にするためにはさらに詳細な検討が必要である。

以上のことから、ストロー内 2 段階グリセリン希釈直接移植法は農家段階での実施が容易であり、移植による受胎性も高いことから、牛凍結胚移植の新技術としての

普及性も高いと思われる。また、グリセリン希釈のための 0.6 M Sucrose 液を等張塩類溶液で調整することによって受胎率を改善できることがほぼ明らかにされた。

稿を終えるにあたり、本研究の野外移植を実施された兵庫県姫路、洲本、和田山家畜保健衛生所担当職員各位に感謝の意を表します。

また、本論文のご校閲を賜った京都大学農学部家畜繁殖学教室入谷明教授ならびにご指導いただいた内海恭三助教授に深謝します。

引用文献

- 1) 猪八重悟, 田崎道広, 立山昌一, ほか: 家畜繁殖技術研誌, 10 (2), 66~69 (1988).
- 2) KENNEDY, L. G., BOLAND, M. P. and GORDON, I.: *Theriogenology*, 19 (6), 823~832 (1983).
- 3) LEIBO, S. P. and MAZUR, P.: *Methods in mammalian reproduction*, DANIEL, JR., J. C. eds., 179~201, Academic Press Inc., New York (1978).
- 4) LEIBO, S. P., WEST III, A. W. and PERRY, B.: *Cryobiology*, 19, 673~674 (1985).
- 5) LEIBO, S. P.: *Cryo-Letters*, 4, 387~400 (1983-A).
- 6) LEIBO, S. P.: *Theriogenology*, 19 (1), 139 (1983-B).
- 7) LEIBO, S. P.: *Theriogenology*, 21 (5), 767~790 (1984).
- 8) LEIBO, S. P.: *Theriogenology*, 23 (1), 201 (1985).
- 9) LINDER, G. M. and WRIGHT, JR. R. W.: *Theriogenology*, 20 (4), 407~416 (1983).
- 10) MASSIP, A., VAN DER ZWALMAN, P., HANZEN, C., et al.: *Theriogenology*, 18 (3), 325~332 (1982).
- 11) 松崎重範, 岩野信也, 青柳敬人, ほか: 家畜繁殖学雑誌, 32 (4), 207 (1986).
- 12) NIEMANN, H., LAMPETER, W. W., SACHER, B., et al.: *Theriogenology*, 18 (4), 445~452 (1982).
- 13) RENARD, J. P., HEYMANN, Y. and OZIL, J. P.: *ANN. Med. Vet.*, 126, 23~32 (1982).
- 14) SCHNEIDER, U. and MAZUR, P.: *Theriogenology*, 21 (1), 68~79 (1984).
- 15) 鈴木秋悦, 北井啓勝, 鎌田絃八: 哺乳動物の初期発生, 妹尾左知丸ほか編, 220~221, 理工学社, 東京 (1981).
- 16) 鈴木達行, 下平乙夫, 藤山雅照: 家畜繁殖学雑誌, 29 (3), 162~163 (1983).
- 17) 鈴木達行, 下平乙夫, 藤山雅照: 家畜繁殖学雑誌, 30 (4), 211~215 (1984).
- 18) 鈴木達行: 畜産の研究, 40 (4), 447~481 (1986).
- 19) 高野 徹, 大崎次郎, 佐藤尚史, ほか: 畜産の研究, 41 (10), 1197~1198 (1987).
- 20) 富永敬一郎, 福島護之: 家畜繁殖学雑誌, 31 (5) 学会号, 69 (1985).
- 21) 富永敬一郎, 福島護之, 小嶋 睦, ほか: 家畜繁殖学雑誌, 32 (4) 学会号, 207 (1986).
- 22) 富永敬一郎, 福島護之: 家畜繁殖学雑誌, 33 (4) 講演要旨, (1987).
- 23) WITTINGHAM, D. G.: *Nature* 233 125 (1971).
- 24) WRIGHT, J. M.: *Theriogenology*, 23 (1), 17~29 (1985).