

## 受精卵(胚)移植技術研究的 現狀과 問題點

金川弘司

日本 北海道大學 獸醫學部

### Research Problems of Embryo Transfer Technology

Hiroshi Kanagawa

Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Sapporo

#### 緒 論

1972~1973년에 걸쳐 캐나다에서 實用化된 牛受  
 精卵(胚)移植(embryo transfer, ET)은 北美를 中心  
 으로 迅速하게 發展되어 왔다. 日本에 있어서도 서  
 서히 試驗研究的 범위를 벗어나 實用化的 길을 模  
 索하고 있다. 表1과 2는 작년 한해동안 農林水産  
 省 種畜牧場과 各県の 畜産試驗場이 實施한 ET 頭  
 數를 나타낸 것이다. 新鮮卵과 凍結卵을 합하면  
 1000頭以上の 受卵牛가 移植에 使用되어 500頭 以  
 上이 妊娠되었다. 여기에다 民間企業의 成績을 더  
 하면 더욱 많은 數의 移植 그리고 受胎例가 있는 것  
 으로 된다.

캐나다와 美國에서는 ET을 使用하여 優良牛를  
 増産해도 이들의 子牛를 販賣할 수 있는 牛市場을  
 國內外에 保有하고 있다. 그러나 日本은 農業과 酪  
 農界가 沈滯狀態에 있으며 牛市場도 活發하지 않은  
 데다, 國外에 대해서는 전혀 販路를 갖고 있지 않  
 은 것이 現狀이다. 人工授精事業을 하는데 있어서  
 사업기구의 統廢合이 많았기 때문에 優良의 雄子牛  
 가 生産되었어도 候補種牝牛로서 사들일 수 있는  
 기회가 적었다. 게다가 人工受精所는 캐나다와 美  
 國에서 優良種牝牛 아니면 種牝牛候補를 빈번히 輸  
 入한 關係로 國內에서 生産된 雄子牛는 더욱더 利  
 用되어지지 않고 있는 傾向이다. 日本에서는 ET에  
 關連된 農業과 畜産의 背景에 問題가 있으며, ET  
 技術面의 研究가 進行된다 하여도 産業과 結付된 發  
 展은 어렵다고 본다.

이번 講演에는 ET의 研究面만 論術하고 經濟性  
 에 대해서는 省略하고자 한다.

ET 研究面에 있어서의 重要한 問題點은 表3에  
 表示한 各項目이라고 생각됨으로 이들 各項目에 대  
 해서 論術하기로 한다.

表 1. 1985年度 農水省種畜牧場 및 各県畜産試驗  
 場에 있어서의 牛新鮮卵의 移植狀況(1985. 4  
 -1986. 3)

品種	移植 頭數	受胎 頭數	未確認	受胎率	流產 頭數
Holstein	376	117	42	35.0%	5
Jersey	2	0	0	0	0
黑毛和種	482	143	54	33.4	3
其他和種	73	34	2	46.4	3
Angus	18	5	1	27.8	0
Hereford	16	4	1	26.7	0
其他品種	13	3	1	23.1	1
計	980	306	101	34.8	12

表 2. 1985年度 農水省種畜牧場 및 各県畜産試驗  
 場에 있어서의 牛凍結卵의 移植狀況(1985. 4  
 -1986. 3)

品種	移植 頭數	受胎 頭數	未確認	受胎率	流產 頭數
Holstein	458	79	88	21.4%	7
Jersey	9	2	0	22.2	0
黑毛和種	591	99	103	20.3	2
其他和種	82	18	13	22.0	0
Angus	27	4	3	16.7	0
Hereford	15	4	0	26.7	0
其他品種	80	17	34	21.3	0
計	1,262	223	141	21.8	9

#### 過剩排卵

소는 單胎動物이며, 一般的으로 1회의 發情同期  
 에 1個의 卵子를 排卵한다. 그러나 소에 ET 技術

을 利用하면 한번에 多數의 産子를 얻을 수 있으며, 이를 위해 過排卵을 誘起하여 많은 數의 卵(胚)을

表 3. 受精卵(胚)移植技術研究上の 主項目

No.	項 目
1	過剩排卵
2	非手術的 方法(卵回收, 移植)
3	受精卵(胚)의 凍結保存(簡易化, 受胎率)
4	雙子生産(肉牛, freemartin)
5	受精卵(胚)의 人爲的 操作
6	受精卵(胚)의 評價方法(生死判定)
7	體外受精
8	性別支配

表 4. 過剩排卵에 影響하는 主要因

	要 因
Hormone	製造會社, 製造 Lot 用量, 力價 投與時期 投與間隔, 反復投與 保存法, 取扱法
牛個體差	年齡 品種 榮養狀態 體重 産歴
其他	季節 地域 環境

回收해 移植할 필요가 있다. 먼저 過排卵을 誘起하는데는 各種의 性腺刺戟호르몬이 利用되며, 이러한 호르몬劑를 供卵牛에 注射하면 多數의 卵子가 發育하여 排卵된다. 그러나 過剩排卵에 影響을 미친다고 생각되는 要因은 複雜하여 過剩排卵數를 正確히 規制한다는 것은 困難한 일이다(表 4).

몇개가 排卵하여 몇개가 移植可能한 것인가를 豫想할 수 있다면 이처럼 좋은 일은 없을 것이다. 특히 ET의 경우에는 日程을 짜는데 受卵牛의 發情同期化도 고려해야 되며, 移植卵數와 受卵牛數를 計劃적으로 맞춘다는 것은 困難하다. 移植卵數가 不足하다. 移植卵數가 不足하여 移植에 使用되지 못

한 受卵牛가 農家에 미치는 經濟的인 負擔은 크다.

今後, 호르몬投與에 對한 卵巢反應이 一律적으로 되도록 調節한다든지, 卵巢反應을 豫測可能하게 하는 parameter을 發見할 必要가 있다고 본다. 호르몬投與時의 供卵牛의 호르몬 혹은 cholesterol 値를 測定하여 卵巢反應을 豫測하고자 하는 實驗이 행해지고 있다. 著者는 PMSG 投與前에 供卵牛의 血清 總콜레스테롤値를 測定하여, 그値가 130mg/dl 以上과 未滿사이에 回收受精卵數에 有意差를 認定한 成績을 갖고 있다(權等, 1986).

### 非手術的 方法

受精卵(胚)의 回收 그리고 移植方法에는 手術的 및 非手術的 方法이 있다. 前者의 回收率 및 移植後의 受胎率이 後者보다 一般적으로 높다. 그러나, 手術的 方法은 麻醉, 切開와 같은 귀찮은 일을 동반하기 때문에, 점차 쉬운 非手術的 方法으로 移行되어 왔다. 今後보다 높은 卵回收率과 受胎率을 얻기 위해, 器具機材 및 術式의 檢討를 더욱 더 할 必要가 있다고 본다.

### 受精卵(胚)의 凍結保存

ET技術의 進歩와 이의 普及과 함께, 人工授精에서 凍結精液을 利用함에 따라 생긴 利點이 受精卵의 凍結保存에서도 期待되고 있다. 많은 生物細胞에서 行하여지고 있는 것처럼, 受精卵을 超低溫下(液體窒素中,  $-196^{\circ}\text{C}$ )에 保存함으로써, 細胞內的 酵素活性, 細胞呼吸, 代謝, 發育, 增殖등이 거의 完全히 停止됨으로, 長期間保存이 可能하다. 1972年 Whittingham 等은 凍結受精卵을  $-196^{\circ}\text{C}$ 에 保存한後, 産子를 얻었다고 한다. 以後 많은 研究者에 의해 追試되어 왔으며, Wilmut와 Rowson(1973)은 牛 胚盤胞를 凍結保存後, 移植하여 最初로 송아지를 얻었다. 1980年 前半에 牛受精卵의 凍結保存에 關한 研究報告가 多數 보이지만, 이의 實施要領이 現段階에서는 아직 複雜하며, 더우기 이의 成功例가 新鮮卵移植의 受胎率보다도 낮으며, 世界中的 凍結融解卵의 平均受胎率은 30% 정도이다. 現在 행해지고 있는 凍結融解의 實施要領을 圖 1과 2에 表示하였다. 이들 各段階에 있어서 檢討를 하여, 實施方法을 簡便하게 하며, 使用器具機材도 改良하여,

## 雙子生産

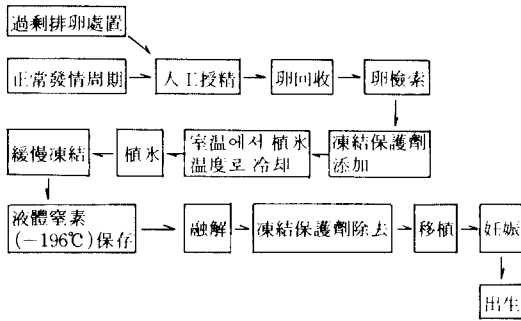


圖 1. 牛受精卵(胚)凍結手順

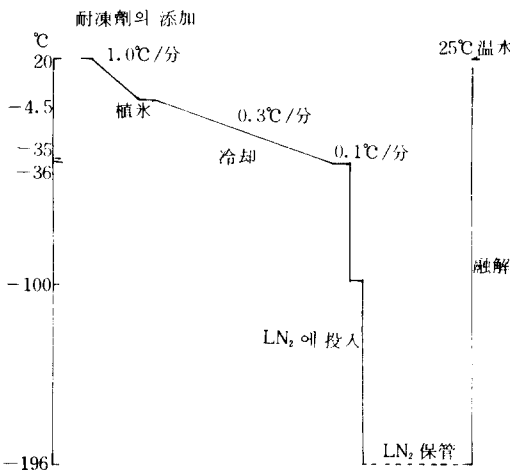


圖 2. 牛受精卵(胚)의凍結과融解方法의 1例

表 5. Mouse 受精卵(胚)의急速凍結法

Glycerin 濃度	凍結·融解後 48時間培養에서 胚盤胞에 達한 比率(%)					
	Laff-nose	Lact-ose	Su-crose	Gluc-ose	Xy-lose	無添加
1 M	0.0	14.3	7.7	2.6	15.9	2.6
2	64.0	80.4	66.7	68.8	60.8	5.3
3	62.9	71.8	72.2	66.0	36.0	7.3
4	14.3	63.3	29.4	38.1	13.0	0.0

게다가 受胎率向上과 연결된 方法이 開發되기를 期待한다.

著者は 特殊한 器具機材를 使用하지 않고 約 15 分間에 全凍結操作을 完了할 수 있는 急速凍結法을 취급受精卵을 使用하여 豫備試驗한 結果 좋은 成績을 얻을 수 있었다(表 5, Takahashi와 Kanagawa, 1985).

雙子生産은 肉牛生産 혹은 肉牛頭數의 增加에 効果的이며 다음의 4 方法이 檢討되고 있다(表 6).

1. 授精한 雌牛에 受精卵을 1個 移植하는 方法, 2. 發情時에는 授精하지 않고 2個의 受精卵을 移植하는 方法, 3. 低單位의 호르몬제를 投與하여 2個의 排卵을 促進시켜, 그後 授精하는 方法, 그리고 4. 受精卵을 人爲的으로 2分離하여 1卵性雙子을 生産하는 方法 등이 있다.

호르몬劑로 人工排卵을 促進할 경우에는 2個에 끝나지 않고 多排卵, 多胎子로 될 可能性이 있으며, 排卵數를 調節한다는 것은 어렵다. 또한, 牛의 경우 異性雙子의 雌子는 freematin 이란 不妊症으로 될 可能性이 높다.

表 6. 牛雙子의 生産方法

種 類	
受精卵(胚)移植	普通 授精後, 他側子宮角에 受精卵(胚)를 移植 片側子宮角에 2個受精卵(胚)를 移植 低側子宮角에 1個受精卵(胚)를 移植
Hormone	低單位 hormone 劑 投與로 2個 排卵期待
顯微操作	受精卵(胚)의 人爲的分割(1卵性雙子)

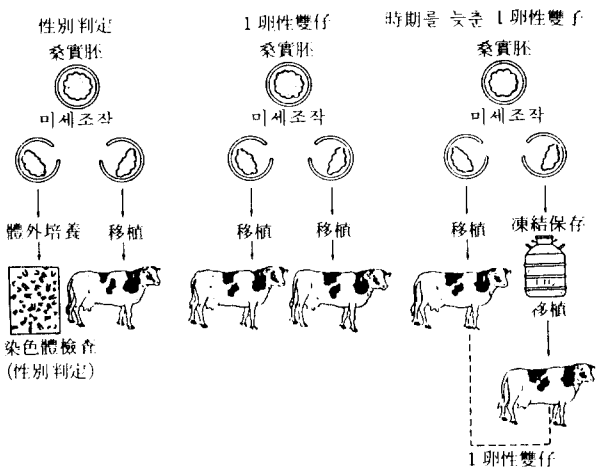


圖 3 牛受精卵(胚)의 人爲的分離의 여러가지 可能性

受精卵을 人爲的으로 2 分離하는 것은 1 卵性雙子 生産뿐만 아니라, 受胎率의 向上, 分離卵의 凍結 保存 그리고 한편의 分離卵을 染色體分析에 使用하여, 性別判定에 利用하는 것도 可能하다. 牛受精卵의 人爲的分離에 의한 여러가지 可能性을 圖3에 模式的으로 表示하였다.

### 受精卵의 人爲的 操作

表7에 現在까지 生産된 1 卵性雙子の 問題點을 列記하여 보았다. 受精卵을 分離한다든지 集合하면, 卵細胞數 및 胚盤胞의 크기에 差가 생기지만, 産子의 크기 및 體重에는 差가 없다(圖4). 受精卵을 顯微操作하는 것에 의해, 無形無心體가 생겼다는지 (Ozil et al., 1983) 2 分離卵에서 生體重이 매우 적은 10kg의 和牛가 태어난 例가 報告되고 있다(金川, 1984). 위와 같은 異常例에서, 受精卵의 體外操作을 하는데 있어서의 論理上의 問題가 提起된다. 實驗動物 및 家畜은 우리들과 같은 哺乳動物로서, 人間生活과 깊은 關係를 맺고 있기 때문에, 受精卵을 無目的으로 혹은 興味本位로 取扱해서는 안되며, 尤

表7. 牛 1 卵性雙子の 疑問點

No.	相違點
1	斑 紋
2	體 重
3	體 格
4	妊 娠 期 間
5	無 形 無 心 體

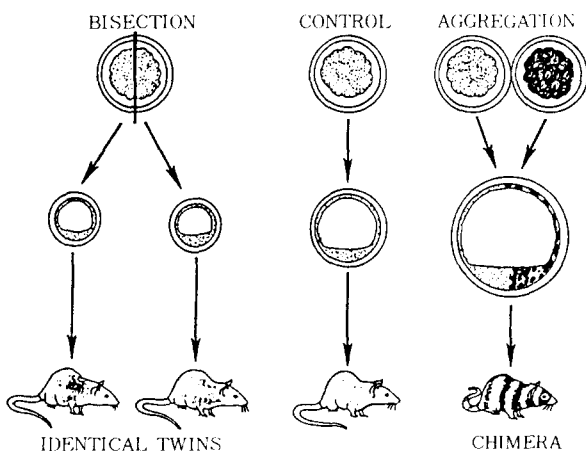


圖4. 受精卵(胚)의 分離와 集合

分한 基礎研究를 한 위에 研究者의 良識을 가지고 取扱하지 않으면 안된다고 생각된다.

### 受精卵의 評價方法

精子와는 달리 運動性이 없는 受精卵의 良否 및 生死判定을 形態學的檢査에 依存함에는 觀察者의 主觀이 強하게 作用한다. 主觀的인 要素가 들어갈 可能性이 적은 보다 客觀的인 受精卵의 生死判別法의 開發이 進行中에 있으나, 아직 이렇다할 完全한 方法을 찾을 수 없다. Renard 등(1980)은 胚盤胞의 glucose uptake 率에 따라 受胎率에 差가 있다는 것을 보고하였다. Schilling 등(1979)은 살아있는 細胞에만 存在하는 Hydrolase와 結合하여 螢光을 發하는 3',6'-diacetylfluorescein을 使用하여, 檢査하는 方法을 보고하였다.

또한 核酸에 親和性이 높은 螢光色素 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI)을 使用하여, 凍結融解後의 犏犏胚盤胞의 死亡細胞를 檢出하였으며, 死亡細胞數에 따른 受精卵發育에의 影響을 檢討한 結果, DAPI螢光染色은 凍結受精卵의 生存性判定에 有效한 것이라고 報告하였다(Low et al., 1986).

### 體外受精

1959年 Chang은 家兎卵子를 使用하여 哺乳動物에서는 처음으로 體外受精 産子를 얻었다. 人間에서도, 1978年 Steptoe와 Edwards에 의해 소위 말하는 試驗管 아기(體外受精兒)의 出産例가 報告되었으며, 世界的으로는 벌써 1000例 以上의 出産例가 있다고 한다. 日本에서도 1983年 東北大學 附屬病院에서 國內 처음으로 體外受精에 의한 出産例가 보고되었다. 人間の 體外受精은 卵管障害가 있는 婦人의 卵巢에서 排卵直前의 卵胞內卵子를 採取하여, 體外에서 남편의 射精精子와 受精시켜, 受精한 卵을 體外에 培養한 後, 婦人의 子宮內에 移植하는 것이다. 體外授精(in vitro fertilization)과 受精卵移植(embryo transfer)의 2 가지 技術로 이루어지기 때문에 IVF-ET라고도 불려진다.

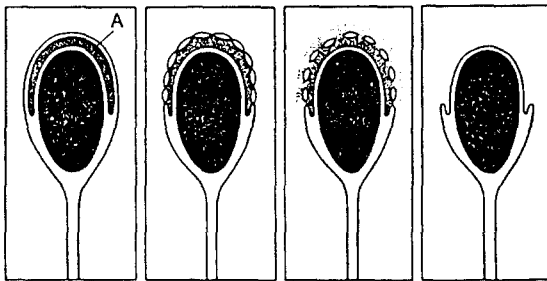
哺乳動物에서의 體外授精에 關한 研究는 多數 報告되고 있지만, 主로 精子의 卵子로 的侵入, 前核形成 그리고 卵割開始를 證明하는 것으로, IVF로 産子를 얻었다는 것은 主로 實驗動物에서였다. 그

表 8. 體外受精에 의한 家畜의 産子例

報告者(年)	家畜
Brackett et al.(1982)	牛
Brackett et al.(1984)	牛
花田·包(1984)	山羊
花田 등(1985)	緬羊
花田 등(1985)	牛
下平 등(1986)	牛
Cheng et al.(1986)	豚
Cheng et al.(1986)	緬羊
吉田 등(1986)	豚

表 9. 牛體外受精의 주된 利用方法

No.	期待되는 利用方法
1	同時에 何種類의 交配組合可能
2	多數의 未成熟卵胞內卵子の 活用可能
3	繁殖障害牛·심한疾病牛의 産仔確保可能
4	受精生理등 學問上貢獻, 其他



A: 先體  
圖 5. 精子의 受精能獲得 經過

러나 近年에 들어서는 表 8에 表示한 것처럼 家畜의 産子例도 보이기 시작했다.

體外受精의 利用法은 表 9에 表示한 것처럼, 예를 들어 生後 얼마되지 않은 雌牛의 卵巢에는 50,000개 以上의 原始卵胞가 存在하는 것으로 알려져 있으며 이러한 原始卵胞에서 卵子를 採取하여 體外受精을 有效하게 活用할 수 있다면, 보다 많은 組合으로 交配가 可能하게 된다.

體外受精에서 受精의 成否에 關係되는 重要한 要因은, 精子의 成熟(受精能獲得, 圖 5)과 卵子成熟의 程度이며, 以後 移植해서 産仔를 얻기 위해서는 受精이 確認된 卵을 適當한 段階까지 體外에서 培養할 必要가 있다.

## 1. 精子의 受精能獲得

수소에서 射出된 精子는 금방은 受精할 能力이 없다. 生體內, 즉 雌牛의 生殖器道內에 射出 혹은 注入된 精子는, 受精場所인 卵管膨大部에 도달할 때까지 受精에 準備하여 機能的인 變化가 일어난다. 즉, 射出精子는 一定時間 雌性生殖器道內에 있을 必要가 있으며, 그동안에 受精能獲得이 일어난다. 受精能獲得現象과 이의 기전에는 不明한 點이 많이 있지만, 精子를 둘러싼 精漿由來의 受精能抑制因子가 除去되어, 精子頭部先體內的 酵素系가 活性化되어지는 것으로 생각되고 있다. 精子의 受精能獲得을 위해, 雌性生殖器道內에 놓아 두는것 이외에도, 여러가지 方法이 檢討되고 있다(表 10).

表 10. 精子의 受精能獲得을 위한 試圖

No.	試 行
1	雌生殖器道內
2	摘出雌生殖器道內
3	體外培養(合成培地)
4	“ (血 清)
5	“ (卵胞液)
6	“ (高 ion 強度液)
7	“ (Ionophore)
8	“ (Caffeine)
9	“ (Chondroitin sulfate)
10	“ (高濃度精子)

## 2. 卵子の 成熟

精子側의 受精能獲得이 誘起되어도, 卵子が 成熟하지 않으면 受精은 成立되지 않으며 精子가 侵入해서도 異常受精이 되는 경우가 많이 있다. 體內에서 거의 成熟된 排卵直後의 卵管內의 排卵卵子 혹은 排卵直前의 卵胞內卵子를 利用하면 比較的 쉽게 受精이 된다.

母體內에서 成熟된 卵子를 使用하는 경우 以外에는, 卵巢內에 있는 未成熟卵胞內卵子(卵母細胞)을 採取하여, 體外에서 成熟시켜 利用하는 方法이 있다. 이 方法은 利用價値가 매우 높지만, 未成熟 卵子が 體外培養에 의해서도 比較的 容易하게 成熟分裂이 再開되기 때문에 完全히 生理的인 成熟이 일어났는지 그렇지 않은지를 알 수 없으며, 今後 發

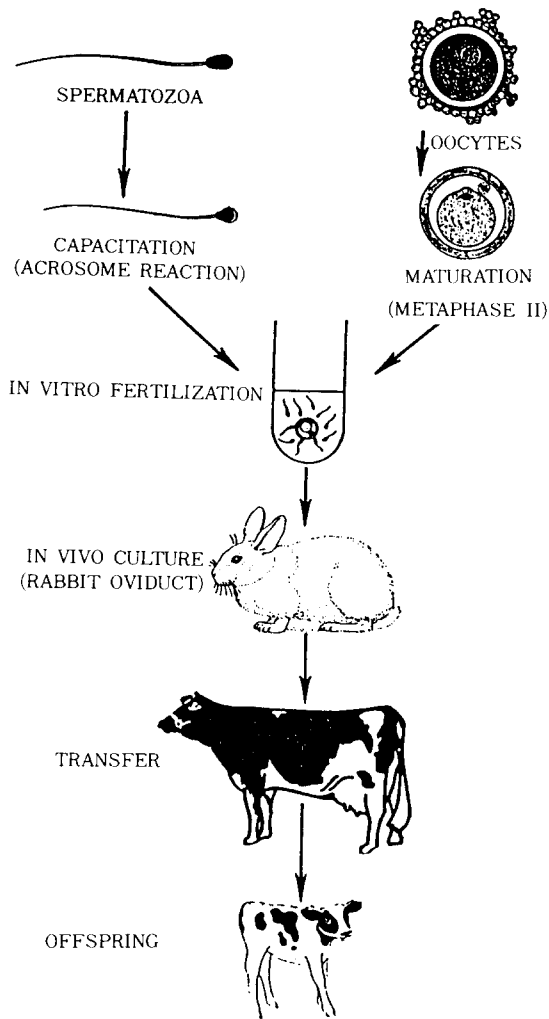


圖 6. 體外受精으로 子牛生産한 1例

展이 期待되는 分野이다.

體外受精으로 子牛를 生産하는 過程의 1例를 圖 6에 模式的으로 表示하였다.

### 性別의 支配 혹은 判定

태어나는 子牛의 性別을 사전에 規制하는 것이 可能하다면 農家의 經營에 미치는 利益은 매우 크다고 본다. 性別의 決定權을 가진 精子를 control 하고자 하는 수많은 實驗이 世界各國에서 行하여지고 있지만 아직 完全히 成功하지 못하고 있다. 그러나 1986年 5月 慶應大學에서, percoll 液의 密度 勾配遠心法을 利用하여 사람精子를 分離하였을때,

試驗管의 最下層部에 沈澱된 95% 以上の 精子가 X精子였으며, 이것을 人工授精한 7人의 婦人에서는 모두 女兒가 誕生하였다고 한다. 더우기 民間 group에서는 24例中 22例의 適中을 報告하였다. 農林水産省福島種畜牧場에서는 上記의 percoll 密度 勾配遠心法을 牛精子에 應用하여 좋은 結果를 얻었다고 한다.

受精卵에서는 移植前에 發育卵의 切取組織을 가지고 혹은 2分離한 한쪽을 가지고 染色體檢査를 하여 性別判定을 하는 方法이 報告되고 있다. 그러나 受精卵을 分離하는 操作, 染色體標本作製法等の 複雜한 技術을 必要로 하기 때문에 아직 實用化되지 않고 있다.

最近에는, H-Y 抗原 및 Y 染色體特有의 遺傳子를 分離하는 方法등의 免疫學的 技術을 利用하여 受精卵中의 雄 혹은 雌의 受精卵을 選擇的으로 選別하

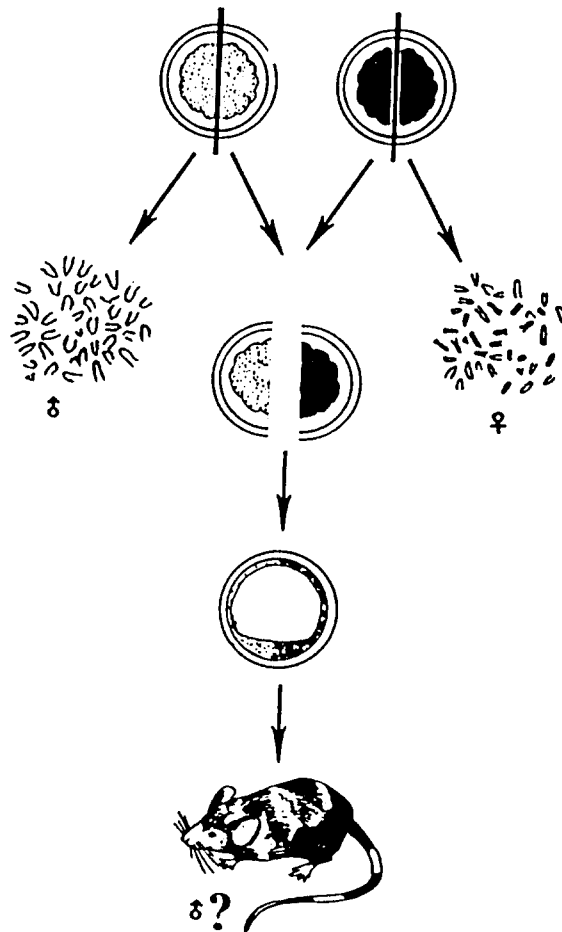


圖 7. 受精卵(胚)의 操作과 性分化의 解明

는 方法이 檢討되고 있다.

著者は H-Y 抗原에 의한 受精卵分離法에 興味를 가지고, 흰쥐桑實胚의 雌雄判別을 試圖하였다. 雌흰쥐에 雄흰쥐의 脾臟細胞를 連續投與한 後에 雌흰쥐의 血清을 採取하였다. 이 血清을 桑實胚가 들어 있는 培養液中에 첨가한 結果, 45.4%의 受精卵이 變性하였으며, 나머지의 正常發育受精卵의 染色體 檢査에서는 89.7%가 XX의 雌型을 表示하였다(Abe, 1985).

今後 圖 7에 表示한 것처럼, 受精卵의 分離, 集合 그리고 染色體檢査를 包含한 ET를 함으로써, 性的 分化라든지 免疫學的 面에 있어서의 新事實의 解明에 어떤 실마리를 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

### 結 論

紙面의 事情으로 ET技術全般의 現狀과 問題點을 網羅하지는 못하였지만 最近의 소위 말하는 biotechnology는 複合된 몇가지 技術이 組合하여 成立되는 경우가 많다. 그래서 하나 하나의 技術에 關한 基礎知識과 技術을 確實히 習得한 위에, 이것들을 組合해 나갈 必要가 있다. ET技術도 例外없이, 表11에 表示한 것과 같은 많은 step이 있으며, 技術的인 問題以外에도 各技術者 水準에서의 協力體制 그리고 各分野에서의 team work가 必要하다고 본다.

表11. 牛 ET技術의 各段階

No.	各 段階
1	Donor와 Recipient의 選擇(傳染病的 有無, 其他)
2	Donor와 Recipient의 生殖器檢査
3	Donor와 Recipient의 發情周기의 確認
4	Donor에 대한 過剩排卵誘起(性腺刺戟 hormone 投與)
5	Donor에 대한 發情誘起(PGF <sub>2</sub> α 投與)
6	Recipient에 대한 發情周期同期化(PGF <sub>2</sub> α 投與)
7	Donor와 Recipient의 誘起發情의 檢査
8	Donor에 대한 受精(凍結精液에 의한 AI)
9	Donor에 대한 卵回收處置之의 準備
10	Recipient에 대한 卵移植準備

- 11 Donor에 대한 卵回收處置(手術的 또는 非手術的 卵管·子宮灌流)
- 12 回收灌流液의 檢査, 卵檢査, 卵分類, 卵取扱과 卵保存
- 13 Recipient에 대한 受精卵의 移植
- 14 Donor 卵回收後의 管理(發情檢査)
- 15 Recipient 受精卵移植後의 術後管理
- 16 Recipient의 妊娠診斷
- 17 妊娠 Recipient의 健康管理
- 18 非妊娠 Recipient의 處理, 再利用
- 19 妊娠 Recipient의 分娩(때로 帝王切開)
- 20 新生仔의 健康管理(登錄, 血液型檢査)

### 參 考 文 獻

1. 阿部啓之, 高橋芳幸, 金川弘司. (1985). 抗雄脾臟細胞血清によるddY系マウス 桑實胚의 雌雄判別. 家畜繁殖誌, 31: 74~77.
2. Brackett, B.G., Bousquet, D., Boice, M.L. Donawick, W.J. Evans, J.F. and Dresser, M.A. (1982). Normal development following in vitro fertilization in the cow. Biol. Reprod., 27:147-158.
3. Brackett, B.G., Keefer, C.L., Troop, C.G., Conawick, W.J. and Bennett, K.A. (1984). Bovine twins resulting from in vitro fertilization. Theriogenology, 21:224.
4. Chang, M.C. (1959). Fertilization of rabbit ova in vitro. Nature, 184:466-467.
5. Cheng, W.T.K., Moore, R.M. and Polge, C. (1986). In vitro fertilization of pig and sheep oocytes matured in vitro and in vivo. Theriogenology, 25:146.
6. 花田章, 包旭日干. (1984). 야기卵子の 体外受精と2-細胞期分割卵の移植による受胎例. 第75回日本畜産学会(名古屋).
7. 花田章. (1985). 야기における体外受精. 家畜繁殖誌, 31: 21~26.
8. 花田章. (1985). 私信(ウシ)における体外受精の出産例
9. 金川弘司, 高橋芳幸, 井上忠恕, 福井豊. 1984. 牛의 受精卵移植, 金川弘司編著, 近代出版(東京).
10. Kweon, O-K., Kanagawa, H., Takahashi, Y., Yamashina, H., Seike, N., Iwazumi, Y., Aoyagi, Y.

- and H. Ono. (1986). Factors affecting superovulation response in cattle. *Jpn. J. Vet. Sci.*, 48: 495-503.
11. Low, B.G., Takahashi, Y. and Kanagawa, H. (1986). Viability of frozen-thawed mouse blastocysts with different number of dead cells. *Theriogenology*, 25: 675-680.
  12. Ozil, J.P. (1983). Production of identical twins by bisection of blastocysts in the cow. *J. Reprod. Fertil.*, 69: 463-468.
  13. Renard, J.P., Philippon, A. and Menego, Y. (1980). In vitro uptake of glucose by bovine blastocysts. *J. Reprod. Fertil.*, 58: 161-164.
  14. Schilling, E., Smidt, D., Sacher, B., Petac, D. and El Kaschab, S. (1979). Diagnosis of the viability of early bovine embryos by fluorescence microscopy. *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.*, 19: 1625-1630.
  15. 下平乙夫, 花田章, 鈴木達行, 酒井豊, 松田修一, 石田隆志. (1986). 凍結保存した体外受精卵による双子生産. 第70回家畜繁殖学会(仙台).
  16. Steptoe, P.C. and Edwards, R.G. (1978). Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet*, 2: 366.
  17. Takahashi, Y. and Kanagawa, H. (1985). Quick freezing of mouse embryos by direct plunge into liquid nitrogen vapor: effects of sugars. *Jpn. J. Vet. Res.*, 33: 141-144.
  18. Whittingham, D.G., Leibo, S.P. and Mazur, P. (1972). Survival of mouse embryos frozen to  $-196^{\circ}\text{C}$  and  $-269^{\circ}\text{C}$ . *Science*, 178: 411-414.
  19. Wilmut, I. and Rowson, L.E.A. (1973). Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. *Vet. Res.*, 92: 686-690.
  20. 吉田光敏, 番場公雄, 小島義夫. (1986). 豚の体外受精卵移植による出産例, 第70回家畜繁殖学会(仙台).