

生殖工学領域の研究の進歩の原点について

Motive Power and Dynamics Making Progress of Studies in the Field of Reproduction Engineering

尾川 昭三

Shyoso Ogawa

生殖工学会 (SSRE) 前会長 (明治大学名誉教授)

〒156-0044 東京都世田谷区赤堤4-16-12

生殖工学会 (SSRE) 創設 10 周年の記念シンポジウムの開催に当たり、この会の設立に携った一人として今までの SSRE の発展に寄与された会員の皆様に心からの敬意と祝意を申し述べる。同時に本日の記念講演の機会を恵与されたことに深謝する。

一昨年、私は、別の学術集会；即ち、日本生殖医療エンジニアリング学会における講演¹⁾で、当生殖工学会の発展に寄与した SSRE 会員の研究業績のうち主として中及び大動物におけるものに焦点を当てて、それらの概要を紹介した経緯がある。そこで、本日は視点をやや変えて、近年の生殖工学発展をもたらした研究の原点の共通性について、関連する業績を極く身近の例の幾つか挙げて紹介する。

1949-53 年、Polge et al^{2), 3)}の画期的

な精子の凍結保存の成功の発表以来、現在に至るまで、凡そ 60 年間に於いて、我々を瞠目させた数々の革新的な生殖工学領域における研究業績は、表 1 の事柄に挑戦して得られた果実であることでは共通性がある。この挑戦の対象の共通性こそが今日の生殖工学研究の進歩の原点となっていて、換言すれば、原動力となっていると考えられる。このように挑戦的とも見られた研究業績にも拘らず、その業績の発表後に日時を経るに従って、それらの研究の実態や成果の意義が、不明瞭になってしまい、一方では、我々は、現在において、それらの偉大な果実のみを享受している例が多くありそうである。そのような身近の例 (主に会員のもの) を想起して、此処にそれらの革新的で今なお、新鮮な研究内容について光を当てるべく述べる。

表 1. 進歩の原点・原動力

- 1.教科書などに記されているような定説或いは学説が長期間に亘り無修正のまま受け入れられていること。
- 2.現時点で実現が不可能視されているか、或いは研究に着手の目途が全く立っていないこと。
- 3.研究で得られた「特に失敗とも受け取れる」結果の判断或いは判定には既定の基準などがそのまま適用されていること。

1. FSH の生理活性物質(ホルモン)としての特定について

今道は、1953-56 年、当時は未開拓であった、ラットのみならず、モルモット、鶏、猫、犬などの動物の下垂体の有効な摘出法の開発に着手し、幾多の困難と試行錯誤を経て、簡便で有効な方法を開発した^{4), 5)}。彼はこのようにして、当時の内分泌の研究進展への有力な武器を手に入れたことになる。周知の如く、彼は下垂体ならびに胎盤由来の性腺刺激

ホルモンの生物学的特質の類似性と差異について調べた昭和 42 年度日本獣医学界賞など優れた多くの業績を有する。その業績の核心の部分の 1 つである下垂体の卵胞刺激ホルモン FSH の研究に焦点を当てて、当時の常識を覆すように、挑戦的とも見られた彼の研究の成果、即ち、FSH は卵胞発育促進作用のみならず排卵そして黄体形成作用を併有するとの結論に至った 1957-65 年の経緯について、その緻密な実験計画と実施の経過の概要を述べる。当時、FSH は純品ではなく(LH は純品)、FSH 標品は LH を混有すると一般に信じられていて、その理由も存在していた。そこで今道は最初に FSH 標品中の混有すると見做される LH 量を予め bioassay (下垂体摘出幼若雄ラット前立腺重量法) で測定した⁶⁾ (図 1 左)。次いで、その FSH 標品による成熟ラットの排卵誘起試験をした結果、図 1 右に見られるように予想したより極めて少量で排卵が誘起された^{7), 8)}。

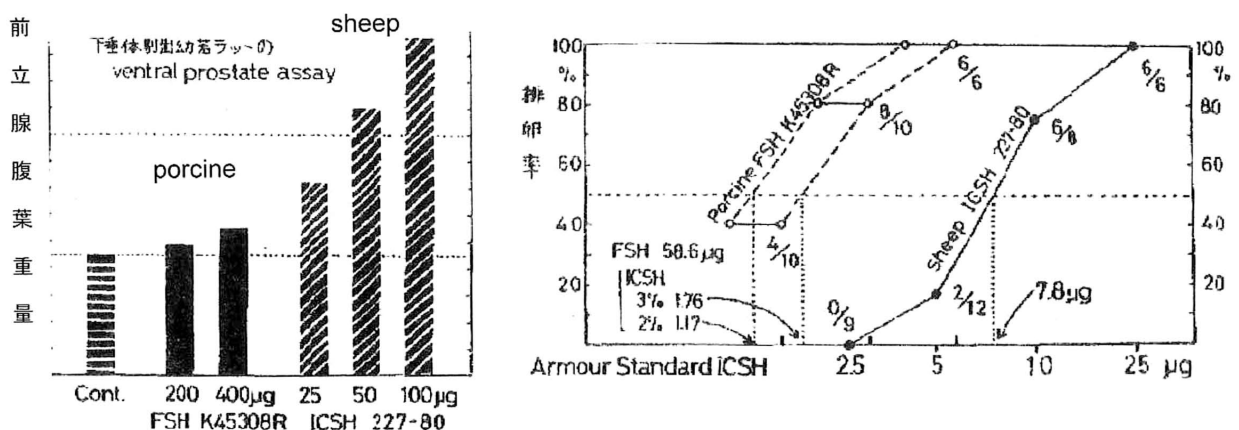


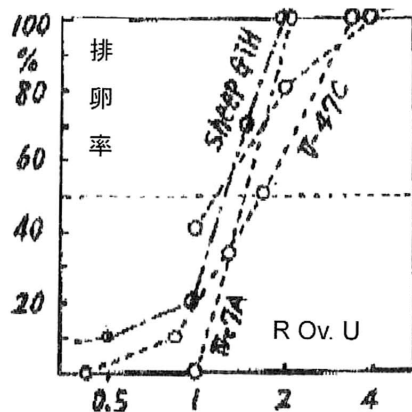
図 1. 下垂体摘出幼若雌ラットを用いた排卵誘起試験概要

左: 前立腺重量による FSH の測定(予備試験)

右: 成熟ラット排卵誘起試験: 微量の FSH で排卵誘起

即ち、この標品の排卵誘起有効量に含まれると見做される混有 LH 量は計算上、LH 単独で排卵誘起が到底不可能な微量の数値となった。FSH の排卵誘起有効量は下垂体摘出幼若雌ラットに投与して卵胞発育を開始させる有効量とほぼ等しく、一方、卵胞発育開始最少有効量の約 8—10 倍の量で下垂体摘出幼若雌ラットの発育した卵胞が黄体化する関

係が認められた^{9), 10)}。その関係値は FSH 標品の純度にかかわらず一定していることが明らかとなった(図 2 右)。図 2 左では、1 排卵単位(50%排卵率)近辺に 3 つ標品 FSH が集結しているのが見られる。これは純度にかかわらず FSH の排卵作用と卵胞発育作用とが共に本来の FSH の性質であることを示している^{10), 11)}。



下垂体標品	最少有効量 MED _{ug}	卵胞発育 刺激単位 ICSU _{ug}	前立腺 単位 Pr.U. _{ug}	1 ラット排卵単位 (R.Ov.U.)			
				ug	MED の倍数	ICSU の倍数	Pr.U. の倍数
Sheep FSH WD V-47C	2~2.5	> 50	82.1	4.0	1.6~2	< 0.08	0.049
Sheep FSH WD IV-7A	7.5	120	195	11.3	1.5	0.094	0.058
Porcine FSH K 45308 R	50	400	> 600	60	1.2	0.15	< 0.10
Porcine FSH PF 593-12 X	50	50	93	70	1.4	1.4	0.75
羊下垂体 GTH Vetrophin	310	< 150	310	370	1.2	> 2.4	1.2
At-moult 標準品 Sheep ICSH 227-80	> 1000	15	17.6	7.8	< 0.0078	0.52	0.44
Sheep ICSH WD V-31B	> 192	6	14.9	13.7	< 0.071	2.28	0.92

図 2.

左: 成熟ラット排卵反応曲線

MED for FSH は、羊 FSH(IV-7A; 2-2.5ug, V-747C; 8.5ug) 豚 FSH(K4580; 50ug) 羊下垂体分割 GTH; 310ug) のいずれも 1 ラット排卵単位、RovU(50%排卵率)近辺に集結する。即ち、FSH 標品の純度に関らず、それぞれの 1RovU と MED for FSH は、ほぼ同量である。このことは FSH の排卵作用は卵胞発育作用と共に FSH 本来の性質であることを示している。

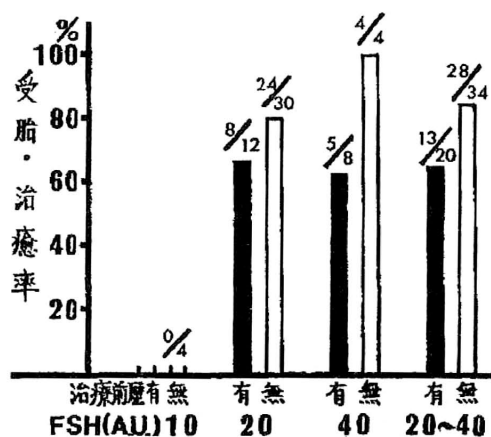
右: FSH 標品の排卵誘起力の強弱は、純度に関係なく卵胞発育作用の強弱と一致する

ほぼ純粋な sheep ICSH (LH) 227-80 の 1 ラット排卵単位は 7.8 ug であり、sheep FSH WDV-47C のラット排卵単位が 4 ug である。従って、4 ug の FSH 中に 7.8 ug の LH が含まれようがない。

これらの数値を参考にして標品の臨床応用試験を行い、彼の推定したとおり、牛馬の排卵障害および卵胞嚢腫を少量の FSH で治療したのみならず、妊娠させることに成功した^{12), 13)} (図 3)。即ち、FSH の排卵作用と卵胞発育作用とを利用して卵胞嚢腫ウシに排卵誘起させ妊娠させる治療法を世界に先駆けて開発

したことになる。彼は下垂体或いは胎盤由来の性腺刺激ホルモンの生物学的性質を複合的に比較する生物学的性質曲線を考案して FSH の判定を行ない、FSH は卵胞発育作用のみならず排卵作用と黄体化作用を本来有する multifunctional hormone であることを再確認した^{14), 15)}。彼が 30—40 年も前に指

摘したことが、その後の高分子化学、糖鎖化学による FSH の構造分析を経て、今日では、FSH が排卵作用と黄体化作用



をも併有することは定説化されるに至っている。

図 3. 牛馬の排卵障害および卵胞嚢腫に対する FSH 投与の臨床応用試験

豚 FSH 製剤(50Armour 単位)の静脈注射が卵胞発育促進用として使用されていた。今道らは 1AU=15RovU と推測して牛の卵胞嚢腫治療量の FSH 静脈注射量を 20AU (3000RovU / 15RovU) に設定して臨床試験を行った。その結果、予想したと通りの良好な治療成績が得られた^{12), 13)}。

2. 牛精液の超急速凍結保存の可能性を示した pellet (錠剤化)凍結保存法の開発について

この方法、すなわち錠剤化凍結保存¹⁶⁾の成功は、現在用いられている生殖細胞の超急速凍結或いはガラス化凍結保存に到達するための保存法の開発進歩の引き金となったと考えられる。1963 年初期の頃までは、1949-1953 年に Polge et al が発表した驚異的な凍結保存法³⁾を踏襲して、修正はあるものの、所謂、緩慢凍結法が有効に採用されていた。この冷却速度をかなり厳密に守ることが当然の如く要求されていた。精子がこれより速い、超急速凍結に耐えられるかどうか、当時は誰もが、そのことに考えが及ばなかったのが実状であった。農林省畜産試験場の永瀬弘技官は、図 4 に示されるように、ラフィノーズとグリセリン添加液で 3 倍希釈、4℃までに冷却した牛精液をドライアイス板上に 0.2-0.3ml 滴下して急速凍結した pellet 状になったものを -79℃ にて保存した。当時は、このドライ

アイス板状に予めアルコール消毒済のパチンコ球を載せておいて、その重みと熱で、適当する穴が出来ると、球を除いて、そこにグリセリン加精液を滴下する方法も利用された。この pellet を別に用意した融解液にて融解して、人工授精した結果、良好な受胎率が得られた¹⁶⁾。この結果が発表された当時には、その革新性、重要性は驚きを持って迎えられたが、必ずしもその適用性について十分に評価されなかった。しかし間もなく諸外国の研究者から正当で高い評価を受け、世界に通用するわが国の独創的な研究であると認められるに至った。彼がこの研究結果を得る数年前に、研究室の片隅で、市販のフリーザー (-25℃) を使いウシ精液を 20 日間から 1 ヶ月間程度の保存可能を目標にして実験を重ねていたことが想起される。当時、ドライアイスならびに -80℃ のフリーザーは高価で、これらの入手も研究費の大きな制約をうけていたからである。

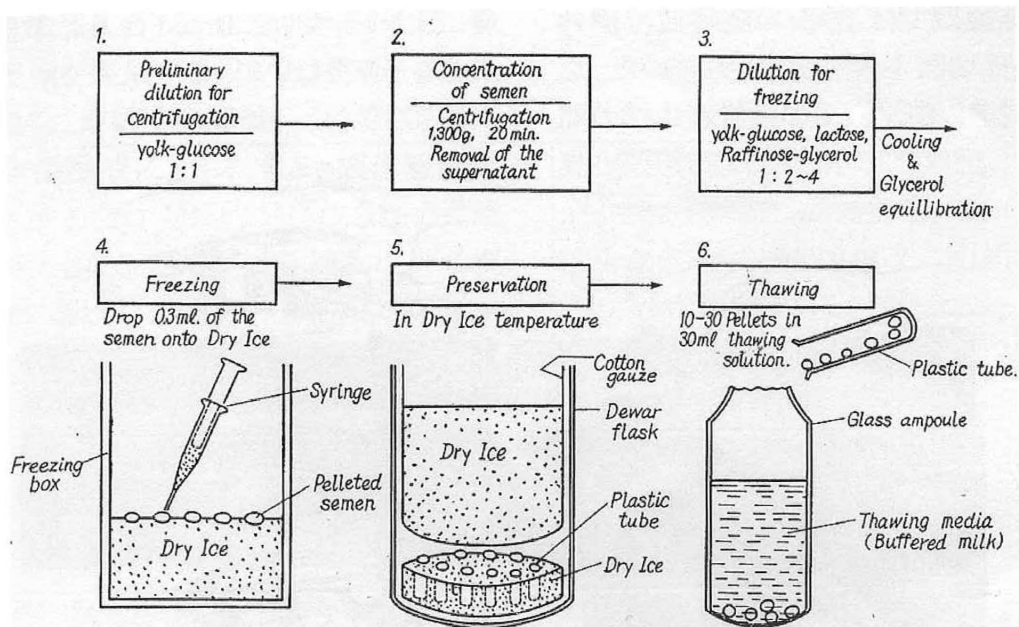


図 4. Procedures of pellet freezing semen [永瀬弘 1963]¹⁶⁾

3. 牛初期胚の子宮頸管経由の移植法の開発について

胚、初期胚の子宮内への移植「挿入」には子宮頸管を通して行われるのが最も簡単で、現在はこの方法が当然の如く用いられている¹⁷⁾(図 5 左上)。然しながら、1975 年頃までは子宮頸管に胚移植用のカテーテルを挿入して子宮角内に胚を移植しても、子宮頸管に挿入の刺激が子宮筋の収縮運動を惹起するので、注入された胚が体外に排出されるとの定説が広く受け入れられていた。その為、日本のみならず諸外国でも複雑で熟練を要する手技や手術を要する方法が専ら利用されていた。その 1 つは、図 5 左下に示す様に腹側切開によって子宮角内に直接胚を注入する所謂、臍部切開法、そして他の 1 つとして、図 5 右のように腹腔内に注入用カテーテルを子宮頸管を迂回させて直腸内に挿入された手指のガイドにより子宮角内に注入

する方法がもっぱら用いられていた。1976 年、Brand et al の研究^{18), 19)}によって子宮頸管経由する簡便な方法が始めて実用可能なことが示された。即ち、彼らは筋活動電位測定により牛の発情後 7 日以降は子宮頸管の刺激による子宮収縮運動が極めて弱くなること¹⁸⁾、そして頸管経由で胚を子宮角に注入しても、それが全く排除されないことを発見した。更に彼等は胚移植用カテーテルが子宮頸管通過の差異に汚染されることが着床率や受胎率を低下させる主要な原因であると報じた¹⁹⁾。この報告を契機として胚移植法が進歩して 1982 年を過ぎる頃から現在利用されている簡便な方法が完成するに至った。我々がその果実を享受しているが、この方法の完成に Brand et al の業績が大きく関与していることを知る研究者が少ないようである。因みに丁度 1980 年には、カリフォルニア州やコロラド州における胚移植施設ならび

に研究機関では、ウシの胚移植は例外なく臍部切開手術が適用されていた。之より 4 年も遡って、この頸管経由法の開

発にチャレンジした Brand et al に敬意を表せざるを得ない。

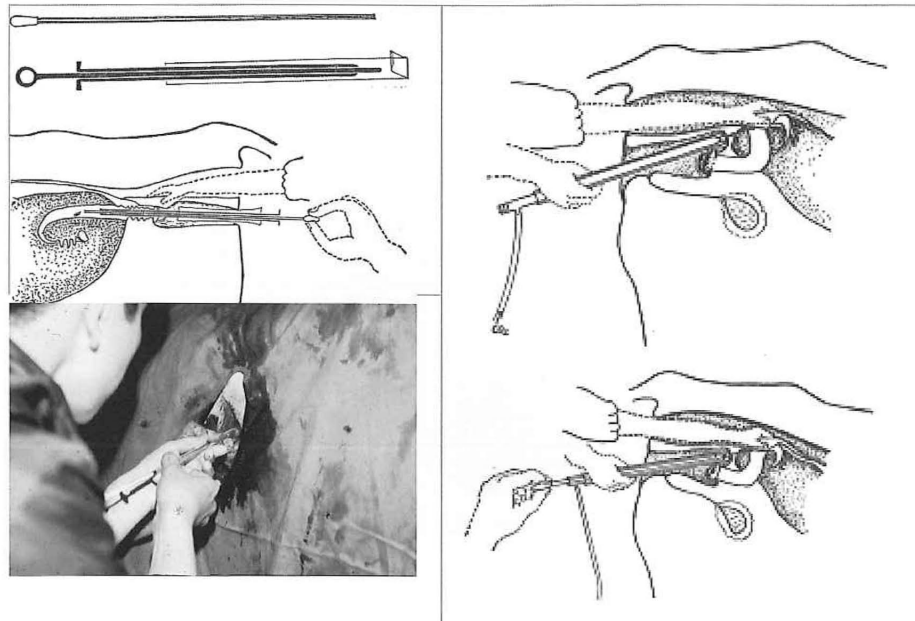


図 5. 牛初期胚の子宮頸管経由の移植法の開発について

左上：子宮頸管経由法，左下：臍部切開法，右：子宮頸管迂回法

(略図：杉江信¹⁷⁾家畜胚の移植から引用)

4. 精子の運動性は顕微授精 (ICSI) には必要があるのか？

極く最近まで、人工授精や体外受精には運動性の高い精子が選択的に利用されてきた経緯がある。1970 年に Edward and Steptoe によって齎されたヒト体外受精の成功²⁰⁾以来、およそ 30 年間も ICSI が殆ど不可能視されて来た。卵子に挿入される精子に、卵細胞質内で発達し受精し得る条件があらかじめ付与されていないからとの定説があったからである。この定説は、20 年以上を経た 1993 年、Van Steirteghem AC et al²¹⁾により、完全に破られた。然しながら、彼らによるヒト精子 ICSI の驚異的な高い成功率が発表された時期でさえも精子の運動

性が不要とは認識されていなかった。現在の簡便で有効な ICSI 発展に貢献したのは、小林ら^{22), 23)}が 1994 年と 1998 年に行った次のような研究によるものである。彼らは、頸部から中片部を顕微ピペット先端部で打撃してガラス板上に圧迫、こすり付けるようにする操作により、精子運動を人為的に完全に停止させて後に、卵子細胞質内に挿入 (ICSI) した (図 6)。その結果、良好な受精率と受胎率が得られた。顕微授精には精子の運動性が必須では無いことが判ったので、今日、多くの胚移植関係者は何の不思議も感じないままこの精子不動化処置方法を使用しているようである。この結果は、現在の簡便な精子超急速凍結保存法の開

発への引き金となったとも考えられる。顕微授精を採用する限りでは、精子または精巣を、最近では卵巣も、必要に応じて凍害保護液に浸したまま、液体窒素に投入するだけで目的が達成される可能性が大となっている。また運動性が必要のないことは、頭部のみを用いての ICSI

の経過から、核の移植、そして最終的には、クローン作出とも関連する研究であったとも考えられよう。今日、この精子不動化処置による ICSI は一般化しているが、その開発された経緯を知る研究者は少なく、その業績も論文に引用されることが少ない様である。

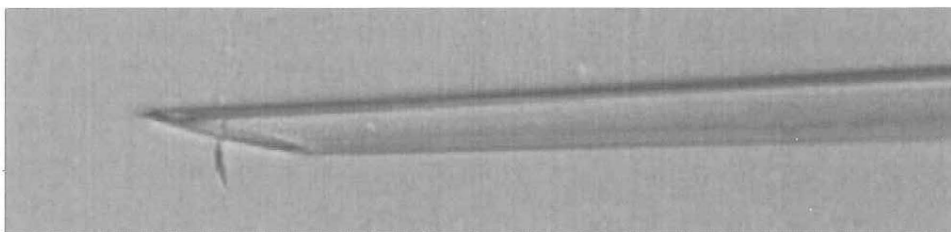


図 6. 精子頸部から中片部を顕微ピペット先端部で打撃
ガラス板上に圧迫、こすり付ける操作

5. ヒト Y 染色体 DNA 特異的塩基配列 (DYZ1) および (SRY) の他の動物 DNA におけるホモログの検出

因みに、これらの研究は、動物生産の性支配を目的とした技術開発とも密接な関連がある。

1989 年、Higashi et al^{24), 25)} は、1986 年に Nakahori et al²⁶⁾ によって公表されたヒト Y 染色体 DNA 特異的的反復塩基配列 (DYZ1) を標的とするプライマーを作製して、魚及びヒトを含む多くの動物から得た DNA について PCR を施した。その結果、多くの動物にこの塩基配列が存在していることを見出した(図 7)。

驚くべきことには、ヒトを除いて、他の動物では両性の DNA にもこの配列が認められ、常染色体上にあることが示された。当時、この発表に対しての反応は皆無に近く、今にして思えば、このホモログの存在の指摘の重要性は、例えば性判定

に対して、当時はあまり認識され得ないレベルであったとも推定される。例えば、1989 年の第 3 回家畜繁殖技術研究会で総括コメントの中に、「本日の発表に記号の羅列のみの提示がありましたが、あれは研究の進歩なのでしょうかね」が有り、又当時の家畜繁殖学会でなされた、この塩基配列の発表後になされた只 1 つの質問では、「用いた血液 0.031ml は多い、1 μ l で十分ではないか」云々であったことなどが印象的である。1989 年、中込ら²⁷⁾ は類人猿とヒトの DNA 塩基配列の比較から、進化の過程で DYZ1 は常染色体から Y 染色体に移動したとの仮説を提唱した。Higashi et al^{24), 25)} の得た結果は、この説を支持する証拠ともなるであろう。

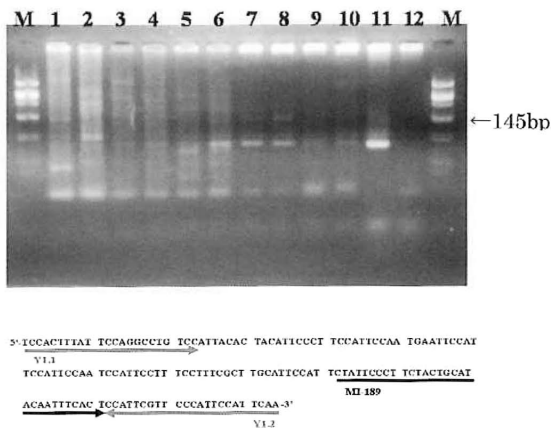


図 7. ヒトY染色体 DNA 特異的塩基配列 (DYZ1)の他の動物におけるホモローグの検出

a: PCR product obtained by using primers Y1.1 and Y1.2. salmon (1and 2), mouse (3 and 4), rat (5 and 6), pig (7 and 8), bovine (9 and 10) and human (lanes 11and 12). M : Size Maker

b: 哺乳類特異的な DNA 断片 Y1.1 Y1.2

間もなく、1990 年に Sincclair²⁸⁾より精巢決定因子 (SRY 遺伝子) のクローニングがなされた。彼らは SRY の HMG (転写因子) box 塩基配列が多くの動物種に保存されていて、Y 染色体特異的であると提唱した。このことは未だ記憶に新しく、我々に強烈なインパクトを与えたことは周知の如くである。1990 年代はこの Sincclair²⁸⁾の考えが多くの研究者の間

に強固に浸透していた。然しながら、間もなく 1991-92 年、石川&岩谷によって、この SRY 様配列 (HMG box 配列) が常染色体上に存在するとの可能性が示唆された。石川ら²⁹⁻³¹⁾は、ウシsry遺伝子の HMG box 領域の DNA 断片を HMG box 内に設定したプライマーでPCR増幅した。その結果、図8に示すように SRY 遺伝子の保存領域についてヒトと牛の相同性は 82%であることを認めた。そして、ウシ雌雄ゲノムに対するドットハイブリダイゼーションと、加えて、さらにより厳しい高温でのハイブリダイゼーションを行った結果、雌ゲノムに微弱シグナルを検出した(図9)。彼らは、常染色体上にも SRY HMG box配列様の配列をコードする遺伝子が存在すると推察した²⁹⁻³²⁾。先述の如く、当時はSRY遺伝子の HMG box 配列は Y 染色体特異的な配列であるとの Sincclair の考え方は強固に定着していた。従って、石川らは彼らが得た微弱なシグナルについてアーティファクトの可能性を完全に否定する研究手段を持たず、強い主張が出来なかった。その後、Whitfield et al³³⁾によって SRY 遺伝子の塩基配列が詳細に解析された結果、石川らの推察の正しいことが証明されるに至った。

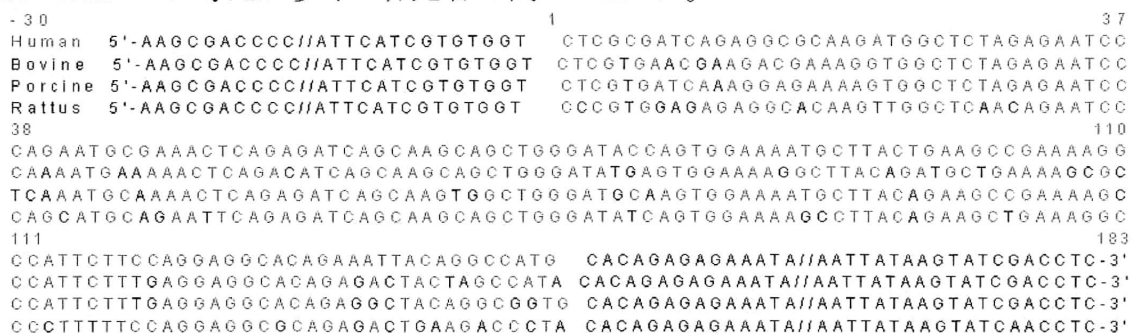


図 8. SRY 遺伝子の保存 (HMG box) 領域とそのホモローグ ヒト-ウシ間の相同性 82%

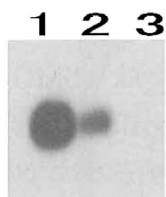


図 9. ウシ sry HMG box 領域をプローブとした

Dot blot hybridization .

1:ウシゲノム DNA♂, 2:ウシゲノム DNA♀,

3:サケ精巢 DNA

6. 新しいトランスジェニック動物生産法の試み

精巢の精細管基底膜上に温存される (stem cell としての) 精粗細胞に外来遺伝子を導入する事が可能となれば、トランスジェニック動物の生産が、その精巢が精子生産を続ける限り、長期間に亘って継続されることになるはずである。卵子の核内への外来遺伝子の顕微注入などに対して、この方法は逆の発想、即ち、

雌性に対して雄性側を、加えて単数の核に対して膨大な数の核を対象にしているという極めて魅力ある革新的な方法となる可能性がある。そして、この方法が確立された暁には、既に知られている精巢経由外来遺伝子導入法 ; Testis-Mediated Gene Transfer, TMGT の名称^{34, 35)}が更に別の新たに相応しいに名称と呼ばれるようになるかも知れない (図 10)。

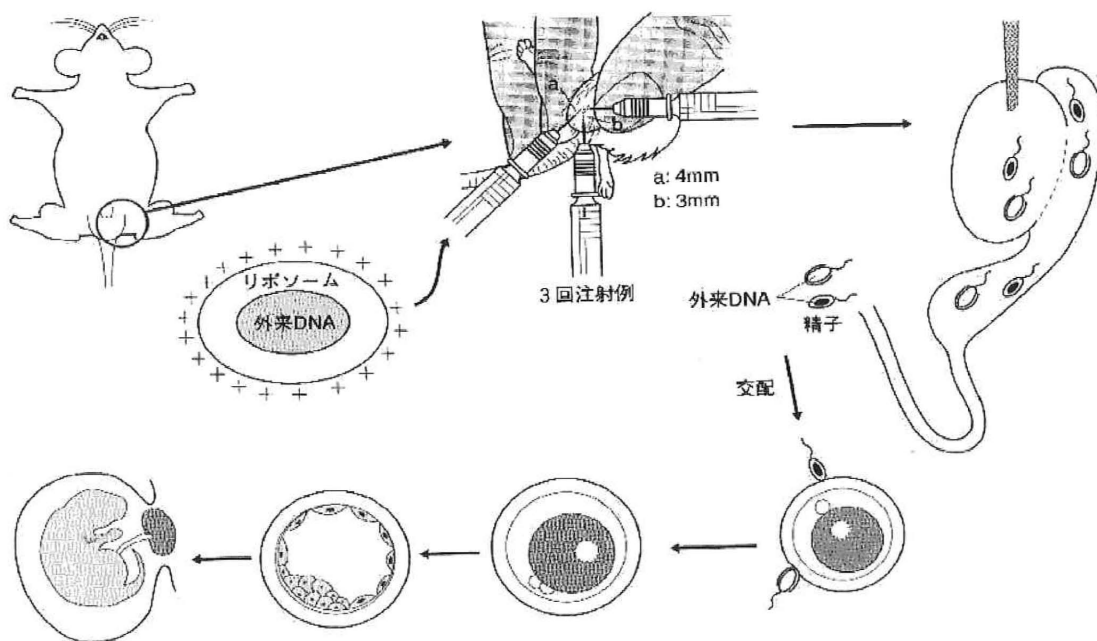


図 10. 外来遺伝子の精巣への直接注射によるトランスジェニック動物作出の過程

尾川³³⁾から引用

図 11 に、最近の多田ら³⁶⁾の成績を示す。図 11 では、外来遺伝子を精巣経由で導入された雄マウスと野生型の雌の交配により得られた産仔に外来遺伝子が伝達さ

れることを示している。これには、この方法の適用の可能性が示唆されている。然しながら、一方において、最近のこの方法の開発研究の結果³⁶⁻³⁹⁾は、初期の

目的を達成することは必ずしも容易ではないことを示して来た。即ち、従来より、例えば、注射針が如何に微細であっても、精巣内への挿入する際には常に精細管をはずれ、精細管内への挿入や精細管を切断することも無いとの見方が支配的であった。この故に、どうすれば注入外来遺伝子が精管壁を通過して、効率良く精粗細胞に到達「接触」させ得るかが、この方法が有効な方法となるために、最初に解決されるべき問題であると指摘されていた。多田ら³⁶⁾は図 12 に示す処置で精細管内に直接外来遺伝子を注入する実験を行なった。この方法によっても、表 4 に示すように低い成功率しか得られなかった。この事実は、精緻な方法により、外来遺伝子を精細管内に直接注入されても、それは期待される良好な率でのトランスジェニック動物生産に繋がらないことを示唆している。精巣に注入された DNA は、恐らく精子形成の後段階の時期(haploid 細胞期)の膜面あるいは膜面下に binding 状態で受精

の際に卵子に送り込まれるとの推定がなされている³⁷⁻³⁹⁾。このことは、SMGT (Sperm Mediated Gene Transfer)を意味し TMGT 本来の魅力的な方法ではないことを示唆している。最近では、精外来遺伝子の到達は容易であるが、精粗細胞膜への到達そして核へのとりこみが難しいとの未発表情報も耳にするようになった。TMGT の完成は、視点を変えると、全精子細胞への外来遺伝子による、決定的且つ一方的な侵略にも相当する事柄である。最近の TMGT による結果が思わしくないことは、一方において、生物種ゲノム保全のための強固な防御機構、例えば、精粗細胞(核)への外来遺伝子進入をガードする構造の存在を窺わせるものである。血液精巣関門などの精細管微細構造もこの防御機構の一部を形成しているのかも知れない。いずれにせよ、上記したように TMGT の完成は、容易でないと見られていることこそ、一方においては、格好の研究の対象ともなり得る可能性があると考えられる。

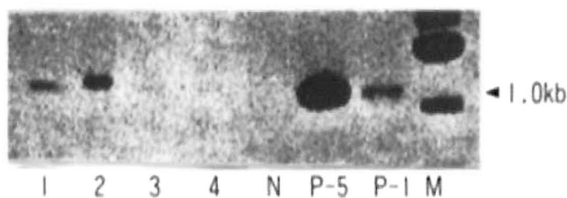


図 11. Cre-loxPシステムで、TMGT法により得られた産子DNAのCre遺伝子のサザンロット解析

P-1: positive control, P-5: positive control 5 copies, NC: negative control, #1, #2: PCR positive

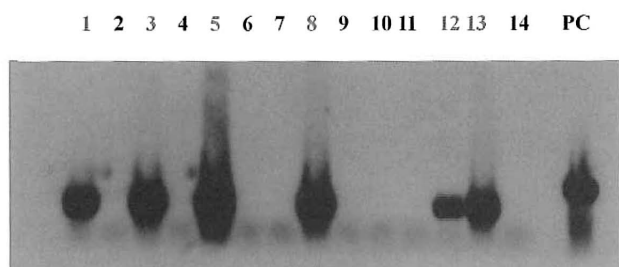


図 12. 生後10日齢でレトロウイルスベクターを intratesticular injection されたマウス由来胎児の羊膜及び胎盤の PCR-Southern

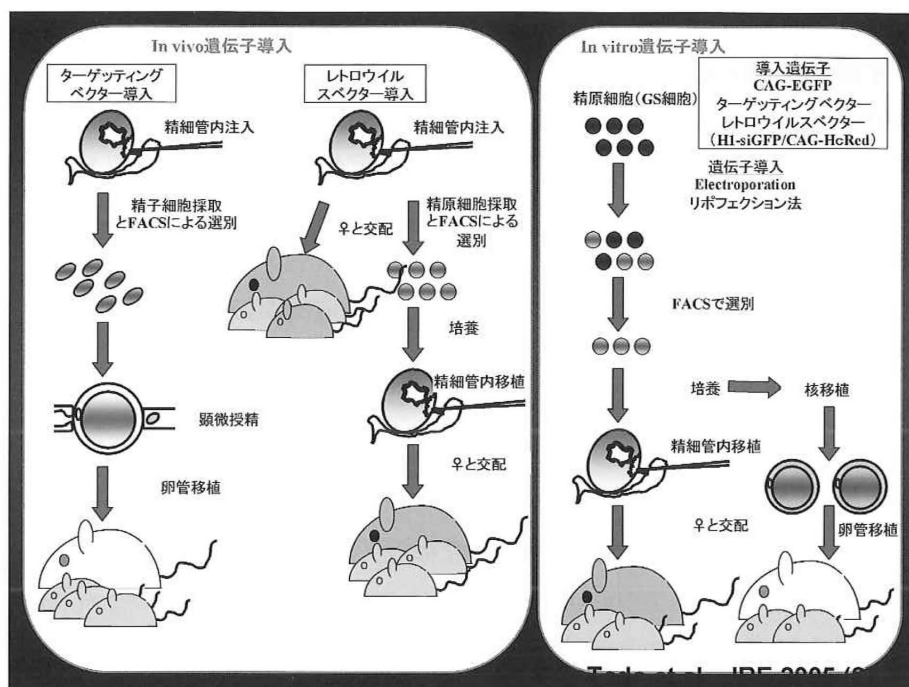


図 12. 外来遺伝子の精子細胞への導入に採用した方法の模式図 (Tada et al 2005)

表4. Production of transgenic offspring by intratubular injection of retroviral vector into mouse testes

Mouse No.	Age	Beginning of mating after injection (days)	No. of offspring	No. of transgenic (%)	No. of Southern(+)
1	8W	63	61	1 (1.6)	0
2	8W	61	55	0	-
3	8W	60	66	0	-
4	8W	60	62	0	-
5	8W	65	58	0	-
6	8W	59	50	0	-
7	10D	60	48	4 (8.3)	0
8	10D	62	58	4 (6.9)	1
9	10D	69	56	0	-
10	10D	63	52	0	-
11	10D	57	64	2 (3.6)	1
12	10D	62	52	2 (3.8)	1

以上述べた 1-6 の研究例だけについても、それらの輝かしい業績にのみ目が奪われて、研究の実態、内容が必ずしも現在の多くの研究者に十分に理解されていないことに鑑み、本日のこの講演が、それらに幾分かの光を当て得たとすれば幸いである。これらの研究で得られた果実の特質は、例えば、精子の

pellet 凍結保存や不動化処置精子の ICSI にも見られるように、関連する研究の理論や技術の進歩を必然的に伴うことになり、そのことが更に周辺技術や理論の開発や進歩を加速することを示している。

おわりに、この講演の冒頭に述べた内容、即ち、研究に着手するに際しての

原点となる項目に関連して、2名の著名な研究者の言葉を参考のため次に提示する。

A. 繁殖学の領域で50年間以上に亘って同じ学説や定説が無修正のまま受け入れられているならば、それこそが格好の研究対象になり得る(Prof. Asdell SA.: Cornell Univ.,

1961年家畜繁殖学研究会春季大会講演)。

B. 常識への挑戦が緑色ダイオード発明の突破口になった(中村修二教授:カリフォルニア大学 サンタバーバラ校), ベンチャーKANSAI 2006年講演 大阪)

引用文献

1. 尾川昭三: 生殖工学に貢献した代表的な研究例について. 日本生殖医療エンジニアリング研究会. 1, 12-13, 2005.
2. Polge C., Smith AU. and Parkes AS.: Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 166, 666-668, 1949.
3. Polge C: Mammalian germ cell. In: Wolstenholm (ed.). Churchill Ltd., 108, 1953.
4. 今道友則, 江藤禎一: 口内接近法による犬及び猫に於ける下垂体剔出術. 日畜会誌, 25, 83-95, 1954.
5. 今道友則: 二、三小実験哺乳動物の下垂体剔出術(モルモット、ラッテ、マウス). 脳下垂体, 医歯薬出版, 東京, 168-188, 1955.
6. 今道友則, 江藤禎一: 下垂体剔出幼若雄鼠の生殖器系に対する Sheep ICSH (LH)の作用. 家繁研誌, 6, 127-130, 1961.
7. 今道友則, 江藤禎一: 下垂体剔出幼若雌鼠に対する Porcine FSH の最小有効量決定試験. 家繁研誌, 5, 113-117, 1959.
8. 今道友則, 江藤禎一: 下垂体剔出幼若雌鼠における Sheep ICSH 投与試験. 家繁研誌, 5, 139-141, 1960.
9. 今道友則, 江藤禎一: 下垂体剔出幼若雌鼠の生殖器系に及ぼす最小有効量の FSH と種々な量の ICSH の同時授与成績. 家繁研誌, 5, 147-150, 1960.
10. 今道友則, 江藤禎一: ICSH および HCG の単一皮下注射による成熟ラットおよびマウスにおける排卵誘起について. 家繁研誌, 7, 103-106, 1961.
11. 今道友則, 江藤禎一: FSH が排卵誘起作用を有する可能性について. 家繁研誌, 7, 159-162, 1962.
12. 塚田努, 池本安夫, 川口擁, 関根宝吉, 今道友則: 軽種馬の卵胞囊腫および排卵障害に対する FSH 剤の筋肉内注射応用試験. 家繁研誌, 21, 7-11, 1975.
13. 加藤寿次, 萩野順三, 石井精二, 川口擁, 関根宝吉, 今道友則: FSH の静脈内注射による乳牛の卵胞囊腫治療試験. 家繁研誌, 22, 23-27, 1976.

14. 今道友則: FSH の所有する排卵誘起作用について. 最新医学, 18, 1207-1211, 1963.
15. Imamichi T: A further study of the ovulation inducing property of the pituitary follicle stimulating hormone. Proceeding 5th Inter Cong Anim Reprod and Artificial Insemination, 3, 391-396, 1964.
16. 永瀬弘: 牛精子の耐凍性の機構に関する研究Ⅲ.いわゆる“錠剤化凍結法“におけるグリセリン濃度および糖類の保護効果について. 獣医学会誌, 24, 505, 1962.
17. 杉江佶: 牛の胚移植. 杉江佶編. 家畜胚の移植. 養賢堂, 234-291, 1989.
18. Brand A., Taverne MAM., Van der Weyden GC., Aarts MH., Dieleman SJ., Fontijne P., Drost M. and De Bois CHW.: Non-surgical embryo transfer in cattle I . Myometrial activity as a possible cause of embryo expulsion. In: Rowson LEA (ed.) Egg Transfer in Cattle. Commission of European Communities, Luxembourg, EUR 5491, 41-56, 1976.
19. Brand A., Gunnink JW., Drost M., Aarts MH. and De Bois CHW.: Non-surgical embryo transfer in cattle II . Bacteriological aspects. In: Rowson LEA (ed.) Egg Transfer in Cattle. Commission of European Communities, Luxembourg, EUR 5491, 57-66, 1976.
20. Edward RG. and Steptoe PC.: Purdy JM. Fertilization and cleavage in vitro of preovulator human oocytes. Nature, 227, 1307-1309, 1970.
21. Van Steirteghem AC., Nagy Z., Liu J., Verheyen G., Smits J., Tournaye H., Liebaers and Devroey P.: Assisted fertilization by subzonal insemination and intracytoplasmic sperm injection. J Assist Reprod Gen, 10, 84, 1993.
22. 小林 一彦, 永井澄絵, 加藤修, 辻敏徳, 豊北美穂, 道蔵康仁, 尾川昭三: 卵細胞質内精子注入法による難治性男性不妊の治療成績. 講演要旨集日本不妊学会誌 39, 559, 1994.
23. Kawashima K., Shintani M., Aoki Y., Tada N., Saga M., Iwaya M., Kobayashi K., Kato O. and Ogawa S.: Fertilizing ability and development of bovine spermatozoa fertilized by mechanical stress with use of intracytoplasmic insemination, J Reprod Engineer, 1, 25-38, 1998.
24. 東庸介, 岩谷誠, 中堀豊, 中込弥男, 尾川昭三.: 鮭、ニシンの精巣ならびに牛血液リンパ球から得た DNA 中のヒト Y 特異反復塩基配列の PCR 法による同定について. 家畜技術要旨, 3, 9-10, 1989.
25. Higashi Y., Iwaya M., Saga M. and Ogawa S.: The base sequence corresponding to DYZ1 is detectable in the DNA from many animal species. J Reprod Dev, 38, 55-59, 1992.
26. Nakahori Y., Mitani K., Yamada M. and Nakagome Y.: A human Y-chromosome specific repeated DNA family (DYZ1) consists of a tandem array of pentanucleotides.

- Nucleic Acids Res, 14, 7569-7580, 1986.
27. Nakagome Y., Nakahori U. and Tamura T.: DNA diagnosis in sex abnormalities. *Jpn J Clin Med*, 589, 445-449, 1989.
 28. Sinclair AH., Berta P., Palmer MS., Hawkins JR., Griffitho BL., Smith MJ., Foster JR., Frishaut A., Lovell-Badge R., and Goodfellow P.: A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*, 346, 240-244, 1990.
 29. 石川孝之, 東庸介, 細川利昭, 岩谷誠, 尾川昭三: ウシ、ブタおよびラットにおける *sry* 類似配列の単離. 家畜学会要旨 84, 6, 1991.
 30. 石川孝之, 東庸介, 細川利昭, 岩谷誠, 尾川昭三: ウシ、ブタおよびラットにおける *sry* 類似配列の決定とその配列を用いた性判別について. 国立小児科病院医療研究センター定例研究発表会, 1991.
 31. Iwaya M., Ishikawa T., Hosokawa T. and Ogawa S.: DNA sequences of sex determining region Y from bovine, pig and rat determined by polymerase chain reaction. 尾川昭三, 加納康彦, 小島昇, 清水茂夫編. 家畜の性支配に関する研究. 明治大学技術研究所報告, 21, 13-25, 1992.
 32. 石川孝之, 駒峰律子, 東庸介, 細川利昭, 岩谷誠, 尾川昭三: ウシ、ブタおよびラットにおける *sry* 遺伝子の単離. 日本分子生物学会講演要旨, 4, 1991.
 33. Whitfield LS., Lovell-Badge R. and Goodfellow PN.: Rapid sequence of the mammalian sex-determining gene SRY. *Nature*, 364, 713-715, 1993
 34. Ogawa S., Hayashi K., Tada N., Sato M., Kurihara T. and Iwaya M.: Gene expression in blastocysts following direct injection of DNA into testis. *J Reprod Develop*, 41, 379-382, 1995.
 35. Tada N. and Ogawa S.: Testis-mediated gene transfer: an alternative method for efficient production of transgenic animals. *J Reprod Engineer*, 1, 39-52, 1998.
 36. 多田昇弘, 安田徹, 佐藤正宏, 肥田野豊子, 望月秀樹, 濱仲早苗, 小野寺雅史, 小川秀興: レトロウイルスベクターを用いた精子幹細胞への *in vivo* 遺伝子導入の試み. 日本分子生物学会講演要旨, 27, 2004.
 37. Yonezawa T., Furuhashi Y., Hirabayashi K., Suzuki M., Takahashi M. and Nishihara M.: Detection of transgene in progeny at different developmental stages following testis-mediated gene transfer. *Mol Reprod Develop*, 60, 196-201, 2001.
 38. Sato M., Ishikawa A. and Kimura M.: Direct injection of foreign DNA into mouse testis as a possible *in vivo* gene transfer system via epididymal spermatozoa. *Mol Reprod Develop*, 61, 49-56, 2002.
 39. Tada N.: Sperm-mediated transgenesis: progress and perspectives. *J Reprod Engineer*, 8, 346-365, 2005.