

低コスト化を目指した胚移植関連技術の開発

谷口 雅康

2008 年

目次

第1章 要旨	1
第2章 緒言	5
第3章	11
研究1: エストラジオールとプロジェステロンを用いた発情同期化プログラムによる 交雑種雌牛における卵胞波、発情排卵動態及び血中プロジェステロン濃度	
緒言	13
材料および方法	14
結果	15
考察	16
研究2: 黒毛和種牛における分娩後の発情誘起が子宮修復と胚回収およびその後 の受胎成績に及ぼす影響	
緒言	20
材料および方法	21
結果	23
考察	24
研究3: 凍結保護物質の組成が牛体外受精胚と牛クローン胚のガラス化保存保存 とストロー内希釈後の生存性に及ぼす影響	
緒言	27
材料および方法	28
結果	33
考察	34
第4章 総括	36
図表	43
謝辞	56
参考文献	57

第1章

要旨

近年、畜産業界において飼養規模の拡大にともない、生産性の向上および省力化を目指した発情・排卵同期化技術が開発されている。一方、黒毛和種牛の繁殖において子牛の早期母子分離、人工哺育法の普及により分娩後の発情回帰が短縮された。そのため分娩後早期に過剰排卵処置を施し、胚回収を行えば、1年のうちに1回の胚回収を含む1産(1年1産1回胚回収)が可能となる。さらに、牛胚の凍結保存方法として、ガラス化保存法が従来の凍結法と同様に効果的であるとされ、特にガラス化保存法は凍結保存に要する時間と設備費用を削減することが可能である。現在、胚移植時に凍結保護物質の希釈が必要でないダイレクト移植法が一般的な手法となっているが、ガラス化保存された胚のダイレクト移植法は、いまだ確立されていない。そこで本研究では、牛繁殖経営の低コスト化および胚移植技術の効率化を目的に、発情同期化プログラムを開発し、1年1産1回胚回収の可能性を検討したほか、ガラス化保存胚のダイレクト移植法を開発した。

研究1では、安息香酸エストラジオール(EB)とプロジェステロン(P)による発情同期化プログラムにおいて処置開始時の発情周期が、新しい卵胞波の出現、その後の発情発現、および排卵に及ぼす影響を検証した。交雑種雌牛5頭を供試し、交差法により3ヶ月間隔で4回実施した。前処置として、プログラム開始前に直腸検査で黄体を確認後、プロスタグランジン $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$)を筋肉内投与することにより発情を誘起し、供試牛の発情同期化を行った。同期化された発情とそれに続く排卵が確認された後に、排卵日を Day0 (Day0 群)とし、Day5 (Day5 群)か Day12 (Day12 群)、あるいは Day17 (Day17 群)に EB 2mg と水溶性 P 200mg を筋肉内投与し (EB/P)、EB/P 処置から 12 日後に EB 1mg を筋肉内投与した。卵巣の超音波診断所見では、各群において、EB/P 処置後新規の卵胞波が出現した。さらに、各群における EB/P 処置から新規卵胞波発現までの間隔に差

は認められなかった(3.2~3.8日)。また、各群すべての供試牛において新規に出現した主席卵胞が排卵した。しかしながら、Day17群において、2回目のEB筋肉内投与日の1~3日前に発情発現がみられた。処置期間中の血中プロジェステロン濃度は、Day12群、Day17群の両群が、Day5群に比較してEB/P処置後、早期に低下した。以上の結果から、処置開始時の発情周期に関係なく、EB/P処置後に新規の卵胞波が出現することが示された。しかし、処置後の発情発現は、処置開始時の発情周期の影響を受けることが示唆された。

研究2では、黒毛和種牛において、分娩後の胚回収を含む1年1産のプログラムを確立するために、分娩後早期のホルモンによる発情誘起処置の有効性を検討した。試験群(5頭)には、分娩後20日目からプロジェステロン放出腔内挿入剤(CIDR)とPGF_{2α}を用いて発情を誘起し、その後、過剰排卵処置による胚回収を行い、胚回収後の発情時に人工授精を行った。一方、対照群は分娩後29日目以降に明瞭な自然発情を示した黒毛和種牛(5頭)について同様に胚回収および人工授精を行った。試験群では分娩後31日目に分娩後3回目の排卵が観察され、対照群に比べ平均10日早く発情兆候が出現した。分娩後31日目の前回妊娠角子宮角直径は、試験群の方が対照群に比べ有意に減少した(P<0.05)。胚回収成績および分娩後の空胎日数において両群間に差は認められなかった。以上のことから、発情誘起処置により、計画的な分娩後の胚回収と人工授精による速やかな受胎が可能であることが示唆された。

研究3では、ガラス化法により凍結された体外受精(IVF)胚と、体細胞クローン(SCNT)胚のダイレクト移植を行うため、凍結保護物質としてのグリセロール(GLY)とエチレングリコール(EG)の組成を検討した。IVFとSCNT由来胚盤胞を40%GLY、30%GLY+10%EG、20%GLY+20%EGのいずれかでストロー内でガラス化保存した。融解後、ストローを1分間垂直に立て、その後、凍結保護物質を希釈するために5分間水平に保持した。融解胚は、凍結保護物質の洗浄除去後72時間体外培養し、生存性および発育能を検討した。それ

ぞれのガラス化液において、凍結融解された IVF 胚および体細胞クローン胚の生存率および脱出胚盤胞への発育率は、ガラス化液の組成の違いによる有意な差は認められなかった。しかしながら、体細胞クローン胚の脱出胚盤胞への発育率は、40%GLY 群が 30%GLY+10%EG 群、20%GLY+20%EG 群に比べ高い傾向にあった。EG を含んだガラス化液で凍結された IVF 胚と SCNT 胚の脱出胚盤胞期への発育率は、新鮮な IVF 胚と体細胞クローン胚を培養した対照胚に比べ、有意に低下した ($P<0.05$)。以上の結果から、凍結保護物質として GLY と EG の組成はストロー内希釈後の胚の生存性に影響を与えないことが示された。しかし、今回開発したガラス化胚のダイレクト移植法は簡便であり、野外での実用化に有効であると思われた。今回の研究で得られたこれらの結果は、牛繁殖経営の低コスト化および胚移植技術の効率化の一助になると考えられた。

第2章

緒論

近年、家畜のバイオテクノロジー技術は大きく進歩し、家畜改良や家畜増殖においては様々な技術が応用されている。特に、優れた能力の個体から多数の産子を生産し、改良の促進が図られているが、なかでも人工授精(AI)技術の発達により優れた遺伝的形質をもつ雄畜からは、数千頭の産子を得ることが可能となり、家畜改良に著しく貢献している。酪農経営においては、遺伝的改良による乳用牛の泌乳能力の向上は目覚しい。一方、飼養規模の拡大の影響もあり、発情発見率および人工授精による受胎率の低下が問題となってきた。この対策として、発情・排卵同期化法が開発され、本法においては外因性ホルモンにより発情・排卵をコントロールできることから、発情発見の省力化および計画的繁殖管理が可能となってきた。

現在、家畜の胚移植(ET)技術が広く普及しており、ETにより優秀な遺伝的能力を持った家畜の産子をより効率的に生産でき、受精卵の広域的な流通により国内外から優秀な家畜の遺伝子を導入することが可能となっている。さらに、乳用種雌牛に黒毛和種牛由来の胚を移植することにより、酪農経営の生産性を向上させることが可能となった。胚移植による生産効率を上げるためには、受胎率を向上させることが重要となるが、様々な要因があり容易ではない。そこで、高い受胎率が期待できる新鮮胚のETを実施するために、より正確な発情・排卵の同期化技術が重要となってきた。

発情・排卵同期化技術では、処置開始時の雌牛の内分泌動態と卵胞波の状態に関わらず、発情・排卵とそれに伴う人工授精(AI)後の受胎が求められる。近年、発情同期化方法において、新規な手法としてエストラジオールとプロジェステロンを併用した方法が開発されている[1-3]。外因性エストラジオールは卵巣内の主席卵胞の発育を抑制し、その効果はプロジェステロンと併用することでより効果的である[4]。ホルモン動態において、エストラジオールは血中FSH濃度を低下させ[1]、プロジェステロンと併用することにより相

乗的なLHパルスの頻度を抑制し[5]、主席卵胞の発育を抑制・退行させる。それに続く血中エストロゲン濃度の低下にともない卵巣内に新しい卵胞波が出現するが、この新しい卵胞波は、血中エストロゲン濃度が低下した後に起こる血中FSH濃度の再上昇に依存している[6]。Bo et al. [4, 7]は、エストラジオールとプロジェステロンの併用処置により、発情周期のステージにかかわらず、エストラジオール投与後に新しい卵胞波が出現することを報告した。しかしながら、エストラジオール投与から新しい卵胞波出現までの間隔および発情発現までの日数に、ばらつきが認められており[8]、Colazo et al. [9]は発情周期の後期に同処置を開始した場合、卵胞退行を誘起するのは困難である示唆している。一方、発情・排卵同期化のために、腔内留置型プロジェステロン製剤を外因性のプロジェステロンとして短期プロトコールで使用することも効果的であるが、高価な製剤を大規模農家において使用する場合、コストが高く経済的ではない。しかしながら、安価な手法であるプロジェステロンとエストラジオールの筋肉内投与のみによる発情同期化に関する報告は少なく、その効果は不明な点が多い。

一方、雌牛には繁殖生理的な制約があり、通常の飼養条件下では、1年のうちに1子以上の産子を得ることは困難である。そこで、黒毛和種牛を含めた肉用種の繁殖経営において、生産性を最大限に向上させるために、分娩後の空胎期間を可能な限り短くして、雌牛の生涯の内に1子でも多くの産子を得る目標として、1年1産が推奨されている。哺乳中の肉用種繁殖牛において、分娩後から初回排卵までの日数は30日から55日と幅があり、多くの場合、初回排卵時の発情徴候は不明瞭である[10, 11]。しかし、分娩直後から卵胞波は発現しており、ボディーコンディションの良好な牛では、初回排卵までに平均 3.2 ± 0.2 個の主席卵胞の成長と退行を繰り返し、その卵胞の成長、退行過程は正常の発情周期の牛と一致するという報告がある[12, 13]。一方、分娩後の子宮修復については、分娩後20日目までに急速に子宮が修復し、その後は緩やかに修復が進行して、完全な子宮修復には40日前後必要とされている[10]。また、子宮修復に要する期間は、

分娩後最初の成熟卵胞の出現や分娩後初回発情と関連性があり、その期間は分娩後の受胎率に影響することが指摘されている [14, 15]。しかしながら、黒毛和種牛の分娩後における卵胞波や排卵、子宮修復との関連性についての報告は少なく、不明な点が多い。

現在では、家畜改良のみではなく、畜産農家の生産性向上という観点から、人為的・外因的なホルモン処理を行うことにより優秀な能力を持った雌畜に多数の卵子を生産させ、これらの卵子から産子を得ることで、多数の産子を得ることが可能となっている。さらに、分娩後早期に過剰排卵処置を施し、胚回収を行えば、1年のうちに、1回の胚回収を含む1産(1年1産1回胚回収)が可能となり、その生産性を上げることができる [16]。そのためには、計画的な分娩後の発情回帰と早期の子宮修復が必要である。このような雌畜側からの家畜改良を目的として、家畜の過剰排卵処置や胚移植(ET)技術に関する研究が進められ、現在では国内で毎年約63,000件のETが行われ、約28,000頭の産子が得られている。

一方、ETに用いる胚を得るために様々な方法が行われており、現在も改良が重ねられている[17-20]。これまでは雌畜に過剰排卵処置を施し、その後、人工授精により家畜の子宮内で受精を行い、受精後7日目の受精卵(胚)を採取する方法が一般的であった。しかし、近年では雌家畜の生体から卵母細胞を採取する(経膈採卵;OPU)方法や、食肉処理場などで卵巢を採取し、研究室内で卵母細胞を回収し、卵母細胞の成熟・受精・発生までのすべての段階を人為的に行う体外受精(IVF)技術が確立され、より効率的な胚の生産が可能となっている。近年、国内においてもIVF胚の移植件数が増加しており、全国では約8,000件の移植が行われるようになった。

家畜における体外受精技術は、当初は主に食肉として解体される雌牛の卵巢から多く産子を生産するための技術であると考えられ、これまで体外受精を主とした受精卵を作出する技術は、優れた遺伝子をもつ家畜を増産するために用いられてきた[21]。しかし、体外受精胚の凍結保存後の移植による受胎率は、過剰排卵処置により採取された体内

受精胚よりも一般的に低いことが報告されている[3]。国内の統計をみても、体内受精胚の移植において新鮮胚で受胎率が約50%、凍結胚でも約45%の受胎率が得られるのに対し、体外受精胚では新鮮胚での受胎率が約42%、凍結胚では約36%の受胎率と10%程度の低下が認められ、より効果的かつ簡便な凍結方法の開発が求められている。その中でも、ガラス化保存法は従来の方法に比べ、凍結保存に要する時間と設備費用を大幅に削減することが可能である。近年、卵母細胞と胚の凍結保存において、ガラス化保存法は従来凍結法と比較してより効果的であると報告されている[22-26]。また、野外における胚移植において、ダイレクト移植は、胚移植時の凍結保護物質の希釈のための操作が不要で、より実用的な方法であり、現在では最も一般的な手法となってきた[18]。凍結胚のダイレクト移植は、用いられる凍結保護物質がグリセロールから[27]エチレングリコールへ切り替わることで[28, 29]、融解後の操作の簡素化がもたらされた経緯がある。

一方、ウシ胚の凍結保存のために多くのガラス化保存法が開発されているが[30]、これら方法の大部分は胚移植の前に凍結保護物質の段階的希釈を必要とする。近年開発された open-pulled straw (OPS)法はガラス化保存されたウシ胚のストロー内凍結保護物質の希釈に成功したと報告している[31, 32]。しかし、この方法では、ガラス化保存胚のダイレクト移植のために、技術者がストロー内希釈を行う際、特殊なストロー操作を必要とする。したがって、野外におけるウシのガラス化保存胚をダイレクト移植するための、より簡便な別法が必要とされている。

これまで家畜改良は体型や血統、産肉成績などの簡易な選抜指標を基に、生産物の品質と量、または飼いやすさなどが求められてきた。しかし、バイオテクノロジー技術の進歩により、このような選抜過程が改善され、さらに体外受精(IVF)やクローン技術などの受精卵操作は、遺伝子組み換えや遺伝子検索のための手法となっており[33]、今後これらの技術を応用した、さらなる家畜改良の向上が望まれている。そのような中、現在では体細胞からの多くのクローン動物の生産が可能になってきており、より大規模での胚の

ダイレクト移植が可能となる効率的な凍結方法の開発が求められてきている。これら背景により、ガラス化保存後のウシの体細胞クローン(SCNT)胚の *in vivo*、*in vitro* での胚発育の研究が行われているが[32, 34]、ガラス化された体細胞クローン胚のダイレクト移植に関する報告は少なく、不明な点が多い。

そこで本研究では、ウシにおける、エストラジオールとプロジェステロンの筋肉内投与による発情同期化プログラムの開発を目指し、プログラム開始時の発情周期がホルモン処置により誘起された新しい卵胞波および発情・排卵に与える影響について検討した。さらに、黒毛和種牛における1年1産1回胚回収が可能なプログラムを確立するために、分娩後早期に発情誘起を行い、その後の子宮修復、胚回収成績および胚回収後の受胎成績に及ぼす影響を検討するとともに、ガラス化保存されたウシ胚のダイレクト移植に応用可能なストロー内希釈法を検討し、ガラス化保存後の IVF 胚と体細胞クローン胚の生存性向上を目的としてエチレン・グリコール(EG)とグリセロール(GLY)の組成を検討した。

第3章

研究 1

エストラジオールとプロジェステロンを用いた発情同期化プログラムによる
交雑種雌牛における卵胞波、発情排卵動態及び血中プロジェステロン濃度

緒言

外因性のエストラジオールとプロジェステロン処置は卵胞波の制御、同期化に有効な手段である。エストラジオールとプロジェステロンで処置された牛では、主席卵胞の発育が抑制され、新規卵胞波が出現する[35]。Bo et al.[7] は、エストラジオールとプロジェステロン処置後、4.3 日で新規卵胞波の出現が起こると報告している。しかしながら、エストラジオール投与から新しい卵胞波出現までの間隔および発情発現までの日数に、ばらつきが認められている[8]。処置開始時の内分泌動態と卵胞波の状態に関わらず、発情排卵とそれに伴う1回の人工授精(AI)における受胎が発情・排卵同期化には求められる。プロジェステロン投与を基本とした発情同期化プロトコールでは、腔内留置型プロジェステロン製剤(CIDR)が用いられており、さらに相乗的にLHパルスの頻度を抑制することで、主席卵胞の発育を抑制するために、エストラジオールが併用されている[5]。発情・排卵同期化のために、腔内留置型プロジェステロン製剤を外因性のプロジェステロンとして短期プロトコールで使用するのでは経済的ではない。しかしながら、腔内留置型プロジェステロン製剤を使用することなく、エストラジオールとプロジェステロン製剤の筋肉内投与による発情・排卵同期化に関しての報告は少ない。

そこで、本研究では、安息香酸エストラジオールとプロジェステロンの筋肉内投与のみのプロトコールにおける投与開始時の発情周期のステージが新規卵胞波の出現、黄体機能および、それに続く発情・排卵に及ぼす影響について検討した。

材料と方法

1. 交雑種牛における発情同期化と卵胞およびプロジェステロンの動態

1-1. 発情の同期化

交雑種(黒毛和種種雄牛×ホルスタイン雌牛、5-10 歳)5頭を供試牛とし、Crossover design により実施した。実験を3ヶ月間隔で行った。すべての供試牛で、卵巢静止、卵巢囊腫などの生殖器疾患は認められなかった。前処置として、プログラム開始前に直腸検査により黄体を確認後、プロスタグランジン $F_{2\alpha}$ (PGF $_{2\alpha}$; 類縁体クロプロステノール、レジプロン-C、帝国臓器製薬、東京) 500 μ g の筋肉内投与により発情を誘起し、各々のウシの発情周期を調整した。PGF $_{2\alpha}$ 投与により誘起された排卵日を Day0 とし、発情周期の前期(Day5)、中期(Day12)もしくは後期(Day17)に、エストラジオール(EB; 安息香酸エストラジオール: 安息香酸エストラジオール注・DS、川崎三鷹製薬、東京) 2 mg とプロジェステロン(P; プロジェステロン水性懸濁注射液、水性オバプロン・20、川崎三鷹製薬、東京) 200 mg を筋肉内投与した(E/P)。E/P 処置後、12 日目に EB 1 mg を筋肉内投与した。EB 1 mg 投与前2日目から1日2回、朝夕に発情行動を観察した。

1-2. 超音波診断装置による卵胞および黄体の動態観察

左右卵巢の観察は、Day0 から E/P 処置開始までは隔日で、E/P 処置開始から排卵を確認するまで毎日、超音波診断装置(5.0MHz 経直腸用電子リニアプローブ、Aloka SDD-500、Aloka、東京)のリアルタイム B モードを用いて直腸壁を介して行った。卵胞は、液を満たした卵胞腔のエコーレベルが低く、エコーフリーに黒く抽出され、内腔と壁との境界が明瞭なものとし、3mm 以上のすべての卵胞直径を記録した。エコー像が球形でない場合、90 度で交わる2つの直径の平均を推定値とした。排卵はエコーによる最大卵胞の消失の確認と同位置での黄体の出現により判定した[2, 36]。卵胞波は主席卵胞と同じ

卵胞群を起源とし、同時に存在するその他の卵胞の集団とした。主席卵胞はその卵胞波中のすべての卵胞で最も成長率が高く、最も直径が大きいものとした。主席卵胞の出現日を卵胞波の開始日とし、その主席卵胞の排卵または退行までを1つの卵胞波とした[37]。

1-3. 血漿中プロジェステロン濃度の測定

採血は E/P 処置開始日から EB 1mg 投与後2日目までの間、隔日で行った。血液は、尾静脈より 18G 採血針を用いてヘパリン処理した真空採血管に採取した。採取した血液は実験室に持ち帰るまで氷中で保存し、1時間以内に 3,000 回転で 20 分間遠心後、分離した血漿を測定する当日まで -80°C で凍結保存した。血漿中プロジェステロン濃度を、市販のキット(オブチェック;川崎三鷹製薬、東京)を用いて測定した。測定内、測定間の係数は、それぞれ 5.4%、10.6%であり、感度は 4.0 pg/well であった。

3. 統計処理

各グループ間の平均値の比較は Stat View4.02 (Windows Software; Abacus Concepts) を用いて、分散分析法 (Fisher's protected least significant difference test) で行った。また、各々の結果は、平均値と標準誤差で示した。発情発現率、受胎率の比較は、カイ2乗検定で比較した。

結果

発情周期のどの時点から、E/P 処置を開始しても、処置開始時の卵巣内における主席卵胞と黄体の直径は各試験区間で有意な差は認められなかった ($P > 0.05$; 表1)。2度目の EB 投与時の主席卵胞 (排卵卵胞) の直径は、三つの試験区間に有意な差はなかった

が ($P > 0.05$)、黄体の直径 (平均 ± 標準誤差) は、Day12、Day17 に E/P 処置を開始した試験区では 8.8 ± 0.49 、 9.2 ± 3.8 mm であったが、Day5 に処置を開始したものでは 12.2 ± 0.6 mm であり、Day12、Day17 の試験区で有意に減少した ($P < 0.05$; 表1)。

すべての試験区間で、E/P 処置開始から、新しい卵胞波の出現までの平均日数に差はみられず、Day5、Day12、Day17 で、それぞれ 3.6 日、3.8 日、3.2 日であった (表1)。すべてのウシで発情徴候がみとめられたが、Day17 試験区では、5頭すべてで2度目の EB 投与前に発情が発現し、Day5、Day12 に比べて、発情発現が有意に早くなった。それに伴い Day17 試験区では、2 頭で2度目の EB 投与前に排卵が確認され、2度目の EB 投与後から排卵までの平均日数が 0.4 ± 0.4 日となり、Day5、Day12 での 2.8 ± 0.2 日、 2.0 ± 0.45 日に比較して、有意に短縮した ($P < 0.05$; 表1)。

血漿中プロゲステロン濃度は、Day12、Day17 の試験区において E/P 処置後から徐々に低下し、E/P 処置後 10 日目にはそれぞれ、0.8、1.0 ng/mL まで低下した。一方、Day5 試験区においては、E/P 処置後 10 日目のプロゲステロン濃度は 8.3 ng/mL で、E/P 処置後 14 日目に 1.0 ng/mL 以下 (0.92 ng/mL) を示した (図4)。

考察

本研究では、EB/P 処置開始時の発情周期のステージにかかわらず、処置から新規卵胞波が 3.2–3.8 日後に出現した。この結果は、処理開始時点の卵胞発育のステージにかかわらずプロゲステロンのインプラント処置と同時に 5mg のエストラジオール-17 β を筋肉内投与した未経産牛において、既存の卵胞が退行し処置後平均 4.3 日新規卵胞波の出現を誘起することができるという Bo et al.[7]の報告を支持する。さらに、2mg EB と 50mg プロゲステロンをあわせて筋肉内投与することにより、平均 4.1 日後に新規卵胞波の出現をもたらしたことも報告されている[38]。同様に、本研究の結果は新規卵胞波を

引き起こすためのプロジェステロンの筋肉内投与がプロジェステロンインプラントや腔内留置型プロジェステロン製剤と同様の効果があることを示した。

新規卵胞波の出現は既存の卵胞波の形態学的あるいは機能的な消滅とそれに関連する FSH に起因することが指摘されている[39]。エストラジオールとプロジェステロンの投与は未経産牛において、エストラジオールの血中濃度の上昇を誘起し、その結果 FSH 分泌に対し負のフィードバック効果を生み、血漿中 FSH 濃度を減少させる[5, 40]。次に、その抑制された FSH は、血漿中エストラジオール濃度が低下することによって再び上昇し始める。エストラジオールは LH パルスの振幅を減少させ、プロジェステロンは LH パルスの頻度を減少させる[5, 40]。本研究における、卵巢の超音波診断装置所見は、EB/P 処理が処置開始時の発情ステージに関わらず、新規卵胞波の出現を引き起こすことを示した。したがって、エストラジオールとプロジェステロンの投与がエストロゲンに依存する FSH とエストラジオールとプロジェステロンの相乗作用に依存する LH の減少を引き起こし、その後、血中 FSH 濃度の再上昇に続いて新規卵胞波が出現するという仮説を支持することができる[3]。

ウシにおける発情同期化において最も重要なことのひとつは、処置開始時の内分泌動態、もしくは、卵胞波にかかわらず正確な発情開始時期を把握することにある。さらに、定時授精プロトコルの効果を比較する場合、発情同期化率が重要となる。本研究において、すべての供試牛が処置開始時の発情周期ステージに関わらず、発情行動を示し排卵した。しかしながら、EB/P の筋肉内投与グループによって、プロジェステロン濃度の動態と、発情・排卵の同期化について違いがみられた。今回、Day17 群において 2 回目の EB 投与の 1-3 日前に発情徴候が観察され、EB 投与から排卵までの時間が短くなっていることを観察した。PGF_{2α} は処置前の発情同期化に使用したが、すべての供試牛において EB/P 処置が発情とそれに続く排卵後に始まっているため、これが牛群間での発情の同期化率の差に影響したとは考えられない。そのうえ、今回の結果では、Day5 群に比

べ、Day12 群と Day17 群において、2 回目の EB 投与時点の、黄体の平均径が減少し、血中プロジェステロン濃度もより早く減少した。血中プロジェステロン濃度が減少し始めると、発育段階にある主席卵胞がその後まもなく排卵する[41]。発情同期化におけるプロトコールにおいて、血中プロジェステロン濃度を高めて、早すぎる発情と不完全な黄体退行を防ぐために通常、酢酸メレンゲストロール、腔内留置型プロジェステロン製剤、プロジェステロンインプラントなどのプロゲスチンを使用する。したがって、発情・排卵同期化が、発情周期後半の黄体後期に開始された牛において、血中プロジェステロン濃度が早く減少し、処置開始からの発情が短縮されたのではないかと推察された。

本研究において、EB/P の筋肉内投与は処置開始時の発情周期のステージにかかわらず、新規卵胞波の出現を引き起こすことができた。しかし、EB/P プロトコールの発情同期化と排卵への効果は最初の EB/P が投与された時の発情周期の段階に影響を受けた。EB/P プロトコールにおいて、発情周期の前期もしくは発情周期の中期(Day5-12)は、発情/排卵同期化を開始するための最適期間である。これらのことから、発情同期化率を高めるために、投与するプロジェステロンおよびエストラジオールの濃度、E/P と EB の投与間隔など、さらなる検討が必要と考えられた。

研究 2

黒毛和種牛における分娩後の発情誘起が子宮修復と胚回収およびその後の受胎成績に及ぼす影響

緒言

黒毛和種牛を含めた肉用種の繁殖経営において、分娩後の空胎期間を短くして、多くの産子を得ることが重要であり、現在のところ1年1産が目標とされている。授乳中の肉用種繁殖牛において、初回排卵までの日数は分娩後30日から55日と幅があり、多くの場合初回排卵時の発情徴候は不明瞭である[10, 11]。しかし、分娩直後から卵胞波は発現しており、ボディーコンディションの良好な牛では、初回排卵までに平均 3.2 ± 0.2 個の主席卵胞の成長と退行を繰り返し、その卵胞の成長、退行過程は正常の発情周期の牛と一致するという報告がある[12, 13]。一方、分娩後の子宮修復については、分娩後20日目までに急速に子宮が修復し、その後は緩やかに修復が進行して、完全な子宮修復には40日前後必要とされている[10]。また、子宮修復に要する期間は、分娩後最初の成熟卵胞の出現や分娩後初回発情日と関連性があり、その期間は分娩後の受胎率に影響することが指摘されている[14, 15]。しかしながら、黒毛和種牛の分娩後における卵胞波および排卵と子宮修復との関連性についての報告は少なく、不明な点が多い。

一方、分娩後早期に過剰排卵処置を施し、胚回収を行えば、1年のうちに、1回の胚回収を含む1産(1年1産1回胚回収)が可能となり、その生産性を上げることができる[16]。そのためには、計画的な分娩後の発情回帰と早期の子宮修復が必要である。

そこで、黒毛和種牛における1年1産1回胚回収が可能なプログラムを確立するために、分娩後早期に発情誘起を行い、その後の子宮修復、胚回収成績および胚回収後の受胎成績に及ぼす影響を検討した。

材料および方法

試験 1: 分娩後の排卵と子宮角直径の変動

株式会社ミック(栃木県那須郡那須町)で飼養されている分娩後 3 日目に離乳した黒毛和種雌牛 10 頭(2~5 歳)を供試牛とし、これらを無作為に 2 群(各群 5 頭)に分けた。両群における新生子牛の体重と産歴に有意差は認められず、またすべての供試牛で胎盤停滞、悪露停滞、子宮内膜炎、膣炎など産後の生殖器疾患は認められなかった。

試験群には、分娩後 20 日目からプロジェステロン放出腔内挿入剤(CIDR; プロジェステロン 1.9g, イージーブリード, 家畜改良事業団、東京)を 8 日間腔内に挿入し、抜去と同時にプロスタグランジン F_{2α}(PGF_{2α}; 類縁体クロプロステノール、エストラメイト, 武田シエリング・プラウ アニマルヘルス、東京) 500 μg の臀部筋肉内投与を行った。対照群は無処置とした。

両群とも分娩後 3 日目から 1 日 2 回、朝夕に発情行動を観察した。発情発見の補助器具として Heat Mount Detector(Kamar 社)を用いた。さらに、分娩後 3 日目から毎日定時に超音波診断装置のリアルタイム B モードを用いて直腸壁を介して前回妊娠側の子宮角直径を計測し、左右の卵巢の形状を観察した。観察は分娩後 3 回目の排卵が確認されるまでの期間行った。妊娠診断時の記録と分娩後の直腸検査所見により妊角と非妊角の判定を行った。妊角の直径の計測は子宮広靱帯の位置で行った[16, 42]。卵胞は、エコーレベルが低くエコーフリーに黒く描出され、内腔と壁との境界が明瞭なものとし、直径が 3 mm 以上のすべての卵胞を計測した。エコー像が正円形でない場合、90 度で交わる 2 つの直径の平均を推定直径とした。排卵は、エコーによる最大卵胞の消失の確認と同位置での黄体の出現により判定した[37, 43]。卵胞波は主席卵胞と同じ卵胞群を起源とし、同時に存在するその他の卵胞の集団とした。主席卵胞はその卵胞波のすべての卵胞の中で最も発育率が高く、直径が最大のものとした。主席卵胞の出現日を卵胞波の開始日

とし、その主席卵胞の排卵または退行までを1つの卵胞波とした[44]。

試験2: 発情誘起後の胚回収とその後の人工授精による受胎までの日数

試験1とは別の農場の分娩後7日目に離乳した黒毛和種雌牛10頭(2~9歳)を供試牛とし、無作為に2群(各群5頭)に分けた。両群における新生子牛の体重、産歴に有意差は認められず、またすべての供試牛で胎盤停滞、悪露停滞、子宮内膜炎、膣炎などの産後の生殖器疾患は認められなかった。試験群(5頭)では、試験1と同様の方法で分娩後20日目から発情誘起処置を行った。また、分娩後29日目から38日目に明瞭な発情行動を示した5頭を対照群として用いた。

試験群では発情誘起処置によって発現した発情日を、対照群では分娩後29日から38日に見られた発情日を起点(Day 0)とし、Day 12からFSH(アントリン, 川崎三鷹製薬、東京)を合計21 AU、朝夕合計7回、4日間の等量投与方法によって筋肉内投与した。Day 14の夕方とDay 15の朝の2回PGF_{2α}(500 μg)を筋肉内投与し、発情発見から12時間後に凍結精液を用いて人工授精を1回行った。なお、発情発見時に性腺刺激ホルモン放出ホルモン(フェルチレリンアセテート:スボルネン, 川崎三鷹製薬、東京)を50 μg 筋肉内投与した。胚回収は常法に従い、人工授精後7日目に非外科的に行い、胚回収後にPGF_{2α}(500 μg)の筋肉内投与および2%ポピドンヨード(動物用イソジン溶液:明治製菓株式会社、東京)50mlの子宮内注入を行った。回収された胚は、既報に準じて胚のランク付を行った[45]。なお、胚回収後、発情が発現した牛に対しては人工授精を行い、その後、発情が回帰した牛には妊娠するまで人工授精を繰り返した。妊娠診断は人工授精後40日目と60日目に直腸検査により行った。

統計処理

各グループ間の平均値の比較は Stat View4.02 (Abacus Concepts 社) を用いて Student-t 検定で行い、各々の結果は平均値と標準誤差で示した。

結果

分娩後の排卵時期と子宮角直径の変動

対照群および試験群において、分娩後初回排卵およびその後の排卵までの平均日数は、それぞれ初回排卵が分娩後 11.2 日と 10.2 日、2 回目の排卵が分娩後 23.6 日と 20.0 日、さらに、3 回目の排卵は分娩後 42.0 日と 31.6 日であった。試験群では、全頭において CIDR 処置によって分娩後 30 日目に発情が誘起され、対照群と比べ 10 日早く 3 回目の排卵が認められた (表 2)。

子宮角の直径は、対照群と試験群でそれぞれ、初回排卵時 94.6 mm と 98.4 mm、2 回目排卵時 67.8 mm と 61.8 mm、3 回目排卵時 49.8 mm と 49.8 mm と、両群とも排卵回数が増えるに従い子宮角の直径が減少したが、各排卵時の子宮角直径において両群間に差はなかった (表 2)。しかし、試験群において 3 回目の平均排卵日である分娩後 31 日目の子宮角直径は 52.0 mm で、対照群の 59.4 mm に比較して有意に短かった ($P < 0.05$)。

両群とも観察開始の分娩後 3 日目に卵胞波は発現しており、初回排卵では分娩後第 1 波の主席卵胞が排卵し、対照群においては、2 回目の排卵も同様に第 1 波の主席卵胞が排卵することが観察された (図 6)。さらに、対照群においては、3 回目の排卵から 3 つの卵胞波を示し、その 3 波目の主席卵胞が排卵する発情周期を示すことが明らかとなった。発情徴候は、分娩後初回排卵時に 10 頭中 3 頭 (試験群 2 頭、対照群 1 頭)、2 回目排卵時に 10 頭中 4 頭 (試験群 1 頭、対照群 3 頭) で発現したが、3 回目排卵時には試験群、対照群ともにすべての供試牛で発情徴候が認められた。

発情誘起後の胚回収成績とその後の人工授精による受胎までの日数の比較

平均回収胚数、移植可能胚率、および凍結可能胚率において、両群間に有意差は認められなかった(表 3)。さらに、胚回収後初回発情発現までの日数において両群間に有意差は認められなかったが、受胎に要した人工授精の回数は対照群(1.3 回)が試験群(2.2 回)に比べ有意に少なかった($P < 0.05$)。また、空胎日数の平均は、対照群 70.0 日、試験群 86.2 日であり、両群間に有意差は認められなかったが、対照群の方が少ない傾向にあった(表 3)。

考察

分娩後の肉用繁殖種牛または黒毛和種雌牛に CIDR を処置することにより、早期に発情を誘起できることが報告されている[46, 47]。本研究においても CIDR、PG $F_2\alpha$ の併用により分娩後早期に明瞭な発情を誘起することができ、分娩後 3 回目の排卵日を 10 日間短縮できることが明らかとなった。一方、対照群における前回妊娠の子宮角直径の変動は既報のものと同様であった[10]。排卵ごとの子宮角直径において試験群と対照群の間に差は認められなかったが、分娩後 31 日目における子宮角直径は、対照群の方が有意に大きいことが明らかとなった。これらのことから、分娩後の子宮角直径の減少は排卵回数の影響を受けることが示唆された。

CIDR による発情誘起後に過剰排卵処置を行った試験群の胚回収成績は、無処置の対照群と差がなく、さらに、両群とも既報の胚回収成績[48, 49] と同等の移植可能胚率および凍結可能胚率であった。しかしながら、胚回収後の試験群の人工授精回数は 2.2 回と、対照群(1.3 回)より多くなり、受胎に要した日数が平均 86.2 日で、対照(70.0 日)に比較して約 16 日延長した。さらに分娩間隔も、目標とした 365 日を超える平均 371.2 日となった。この分娩間隔の延長は、胚回収後の初回発情で全頭が不受胎であったことによ

るものと考えられた。一方、実験 1 では CIDR 抜去後 2 日後に全頭が発情したが、実験 2 では 2 日から 6 日とバラツキがみられた。また、胚回収後の初回発情も、予想した 7 日後よりも遅く、8 日から 11 日後に観察された。このように CIDR 処置後および胚回収後の発情発現のバラツキが分娩間隔の延長の原因の 1 つと思われた。これらのことから、1 年 1 産 1 回胚回収が可能なプログラムを確立するためには、胚回収後の人工授精による受胎率の向上と、発情発現のバラツキを抑えるための正確な発情同期化方法を確立する必要があると思われた。

本研究において、分娩後 20 日目から CIDR 処置を行うことにより、分娩後早期に発情を誘起し、分娩後 3 回目の排卵日を短縮できることが判明した。さらに、その発情を起点とした過剰排卵処置によって胚回収を行った結果、無処置の対照群と同等の胚回収成績を得ることが明らかとなった。胚回収後の初回発情での低受胎率を向上させることにより、胚回収を含む計画的な 1 年 1 産が可能であることが示唆された。

研究3

凍結保護物質の組成がガラス化保存した牛体外受精胚と体細胞クローン胚
のストロー内希釈後の生存性に及ぼす影響

緒言

近年、卵母細胞と胚のガラス化保存法が従来の凍結法と同じくらい効率的であると示唆されている[22-26]。従来の凍結法と比べると、ガラス化保存法は凍結保存に要する時間と設備費用を削減することが可能である。野外において、胚のダイレクト移植は、胚移植時の凍結保護物質の希釈のための胚の操作が必要ではないことから、より実用的であると思われる。さらに、ウシの胚移植における凍結保護物質のストロー内希釈ダイレクト移植は従来の凍結法に比べ広く一般化してきた[18]。ダイレクト移植は、凍結保護物質をグリセロールから[27]エチレングリコールへ切り替えることで[28, 29]、融解後の操作性の簡素化をもたらした。ウシ胚のために多くのガラス化保存法が開発されているが[30]、これらの方法の大部分は胚移植の前に凍結保護物質の段階的除去を必要とする。近年開発された open-pulled straw (OPS)法はガラス化保存されたウシ胚のストロー内凍結保護物質の希釈を可能としたが[31, 32]、ガラス化保存胚のダイレクト移植のためには、技術者がストロー内希釈を行う際に、特殊なストロー操作が必要である。したがって、野外におけるウシのガラス化保存胚のダイレクト移植のためにはより簡便な方法の開発が必要である。

現在、体細胞から多くのクローンの動物の生産が可能になってきており、大規模農場において移植する際に、凍結クローン胚のダイレクト移植が可能な凍結方法の開発が求められている。ガラス化保存した牛体細胞クローン(SCNT)胚の *in vivo* や *in vitro* での胚発育の研究が行われているが[32, 34]、ガラス化された体細胞クローン胚のダイレクト移植に関する報告は少ない。

そこで、本研究では、ガラス化保存されたウシ胚のダイレクト移植に応用可能なストロー内希釈法を検討した。さらに、ガラス化保存後の IVF 胚と体細胞クローン胚の生存性を向上させるために、エチレン・グリコール(EG)とグリセロール(GLY)の組成を検討した。

材料および方法

牛体外受精胚の作出

牛未成熟卵母細胞の成熟培養、体外受精、発生培養による牛体外受精胚の作出は Mori et al.[50]の方法により実施した。食肉処理場由来の卵巣を、30°Cの生理食塩水(0.85%[w/v]NaCl)を用いて2時間以内に研究室に搬送した。卵胞内の卵丘細胞付着卵母細胞を、18G 針付5ml シリンジを用いて卵巣表面の卵胞 (直径 1~7 mm)より吸引採取した。採取した未成熟卵母細胞は、修正リン酸緩衝液(エンブリオテック;日本全薬工業、福島)を用いて2回洗浄し、正常な卵母細胞(卵丘細胞が3層以上あり、細胞質の均質なもの)のみを実験に供した。これらの卵母細胞は5%牛胎子血清と抗生物質(100・g/ml ストレプトマイシン+100IU/ml ペニシリン)を添加した成熟培地(TCM199;Gibco 社)に移した。採取された約100~150個の卵母細胞を、成熟培養用シャーレを用いて5%CO₂の気相条件下で21時間、成熟培養を実施した。

成熟培養後の卵母細胞は、牛凍結精液と BO 液を用いて体外受精を実施した[51]。凍結精液を37°Cのウォーターバスで1分間融解し、精液は牛血清アルブミン(BSA)無添加、10mM テオフィリン(Sigma 社)を添加した BO 液中に移した。その後精液は、5分間500xgの遠心処理によって2回の洗浄を行い、精子数が 5×10^6 /mlとなるように、牛血清アルブミン(BSA; 3mg/ml; Sigma)、ヘパリン(10・g/ml; ノボヘパリン1000)および5mM テオフィリンを添加した BO 液を用いて調整した。成熟した卵母細胞を体外受精用の精子ドロップに移し、5時間の体外受精を実施した後、各卵母細胞を、発生培地(5%FBS、抗生物質、5・g/ml インシュリンを添加した TCM199)に移し、5%CO₂、38.5°Cの気相条件下で発生培養を行った。

体外受精後48時間目(2日目)に、発生培地の交換を行うとともに、胚を囲む卵丘細胞をピペッティングにより除去した。このとき、シャーレの底面に付着した卵丘細胞を除去し

ないよう卵丘細胞を胚から遊離した。胚の発育を受精後24時間毎に、顕微鏡(×200;オリンパスIMT-2)下で観察した。形態学的に正常な胚盤胞を体外受精後7~8日に採取し、同じ直径を持つ胚盤胞を各実験グループに分けた。

体細胞クローン胚の作成

卵子の体外成熟

卵巣から採取したウシ卵子は5%FBS、0,02AU/mlのFSH(Gibco)、50 μ g/mlのゲンタマイシンを含むTCM199(Gibco)培養液で洗浄後、それぞれミネラルオイルで覆った2mlの培養液内に移し、38.5 $^{\circ}$ C、5%CO₂の気相条件下で22時間培養を行った。

ドナー細胞の準備

ウシ由来の体細胞は卵母細胞-卵丘細胞複合体をガラスピペットでピッペッティングし、得られた卵丘細胞を、0.25%(w/v)トリプシンEDTAに15分浸した。その後、10%FBSを含む α MEM(Gibco)培養液内に移し、遠心機で500 \times gで5分間洗浄を2回行い、得られた体細胞を、それぞれ5%FBS、0,1%MEM non-essential amino acid solution 100X(Gibco)、50 μ g/ml ゲンタマイシンを含む α MEM内で38.5 $^{\circ}$ C、5%CO₂の気相条件下で培養皿が飽和状態になるまで培養した。

除核処理

成熟培養後、各卵子は径の小さいピペットを用い裸化した後、第一極体の放出が囲卵腔に認められたもののみを用いた。裸化した卵子は5 μ g/ml Hoechst33342(Sigma)、5%FBSを含むPBS内に5分間染色した。染色した卵子を5 μ g/ml サイトカラシンB、5%FBSを含むPBS(マニピュレーション液)に移した。除核はマイクロマニピュレーターを用い

て行い、卵子をホールディングピペットで第一極体が見えるように保定し、カッティングニードルを第一極体と細胞質の間に穿刺し、細胞質を傷つけないように透明体を切開させた。その後カッティングニードルで卵子を真上から圧迫し、第一極体と周囲の細胞質を透明体切開部から押し出し、除核した。また、除核が成功したかどうかは、押し出した第一極体と周囲の細胞質に蛍光を当てて確認した。除核した卵子は 0.4%BSA、5 μ g/ml インシュリン、50 μ g/ml ゲンタマイシンを含む mSOF[54]内に保存した。

細胞移植

培養した体細胞は、FBS不含の α MEMで洗浄後、0.05%トリプシンEDTAを加え、3分間保温し剥離させた後、5%FBS、1%MEM non-essential amino acid solution 100X (Gibco)、50 μ g/ml ゲンタマイシンを含む α MEM でピペッティングした。15ml容量のチューブに移し、1800rpmで 5 分間遠心分離後、上清液を除き、単離したドナー細胞を得た。細胞の移植は、保存していた除核済みの卵子と、単離したドナー細胞をマニピュレーション液に移し、マイクロマニピュレーターを用いて行った。ホールディングピペットで除核の時にできた透明体の切開部位が確認できるように卵子を保定し、ドナー細胞を吸引した移植用ピペットを卵子の透明体の切開部位から刺し入れ、囲卵腔内にドナー細胞を挿入した。細胞移植した卵子は、0.4%BSA、5 μ g/ml インシュリン、50 μ g/ml ゲンタマイシンを含む mSOF 内に保存した。

活性化処理

融合液は Zimmermann 液を用いた。4 穴シャーレにそれぞれ Zimmermann 液:mSOF 液が 1:3、2:2、1:3、4:0 となるように調節し、保存していた移植済み卵子を Zimmermann 液濃度が薄い順に平衡させた。Zimmermann 液で平衡させたウシ由来卵子は LF101 を用い、シャーレに 40 μ l ドロップを作り、各ドロップに平衡済み卵子を 10 個程度ずつ移し、ドナー

細胞と卵子の細胞質が接触し、且つ一直線に並ぶようにホールド型電極で左右から挟み電流を1回流して融合させた。電気融合処理後、融合を確認し、0.4%BSA、5 μ g/ml インシュリン、50 μ g/ml ゲンタマイシンを含むmSOF で洗浄した後、10 μ g/ml cycloheximide、0.4%BSA、5 μ g/ml インシュリン、50 μ g/ml ゲンタマイシンを含むmSOF の100 μ lドロップ内に移し、38.5°C、5%CO₂の気相条件下で5時間活性化処理した。活性化処理した胚は、体外培養用培地で数回洗浄後、培養した。

体外培養

ウシ卵子由来の再構築胚は、0.4%BSA、5 μ g/ml インシュリン、50 μ g/ml ゲンタマイシンを含むmSOFの体外培養用培地で72時間培養した後、5%FBS、5 μ g/ml インシュリン、50 μ g/ml ゲンタマイシンを含むmSOFで4日間培養した。形態学的に正常な胚盤胞を融合後7~8日に採取し、同じ直径を持つ胚盤胞を各実験グループに分けた。

ガラス化保存

IVF胚と体細胞クローン胚は、0.3%(w/v)BSAと抗生物質を加えたTCM-199で洗浄した。なお、牛胚盤胞はEGよりGLYの方がその透過性が低く、GLYの浸透速度がEGより遅いことが示されており[55]、胚への凍結保護物質の浸透は、暴露時間が増加するのに従って増加することから、凍結後生存能力に影響を与えることが示されている[24]。したがって、胚はまず10%(v/v)のGLY(和光純薬工業)を加えたTCM-199液内で2分間、室温(23-25°C)で平衡し、続いて20%GLYを含むTCM-199液内で2分間平衡した。その後ガラス化保存液へ移した。胚は、ガラス化保存後のIVF胚と体細胞クローン胚の生存性におけるEGとGLYの組成比の影響を検討するために3つの異なったガラス化液に移した。ガラス化液はTCM-199に0.6Mのショ糖と40%GLY、30%GLY+10%EGまたは20%GLY+20%EGのいずれかを加えて作成した。それぞれのガラス化液では、胚を最初に、

冷却したガラス化溶液ドロップ(30 μ L)内に移し、次に、平衡のために連続して異なる新鮮なドロップに二度移した。胚(1ストローあたり2-5胚)を含むガラス化液(約30 μ L)を、ピペットを使用して0.25-mLのプラスチック製ストロー(I.M.V., L'Aigle, フランス)に充填した(図7A)。ストローの端はパウダーで封をし、ガラス化液と胚がストローに充填された後、ガラス化液とショ糖溶液が混合するのを防ぐために、ストローを垂直に保持した。胚とガラス化液を含むストローをおよそ半分まで急速に液体窒素に浸し、そして、ストローの破損を防ぐために残りの部分をゆっくり浸した。胚はガラス化液へ暴露してから2分以内に液体窒素でガラス化保存された。

凍結保護物質のストロー内希釈と生存性の検討

液体窒素内で5日間以上の保存した後に、ストローは20°Cの温水で融解した。その際に凍結保護物質とショ糖溶液を混合するために1分間、垂直に保持した後、逆にして保持混合した。次に、封部分を切断し、ストローを水平に5分間、凍結保護物質を希釈するために保持した(図7B)。希釈後、ストロー内容液を培養皿に出し、胚を直ちに新鮮な培地に移して二度洗浄した。洗浄後、胚を72時間、卵丘細胞と共培養し、24時間間隔で72時間観察した。胚の生存率は、48時間培養後の胚胞腔の再形成に基づいて評価した。72時間培養後の胚盤胞の脱出率も評価した。また、対照として、新鮮なIVF胚と体細胞クローン胚を培養した。

統計処理

胚の生存率と発生率について分散分析法を用いて検討した。平均値の有意差は、post-hoc および Fisher's protected least significant difference test (PLSD テスト)によって比較した。データは平均値±標準誤差として表した。

結果

ガラス化保存後、体外培養された体外受精胚の生存率と脱出胚盤胞への発育率は、ガラス化液の組成において有意差は認められなかった(表 4)。同様に、ガラス化保存後、体外培養された体細胞クローン胚の生存率と脱出胚盤胞への発育率は、ガラス化液の組成において有意差は認められなかった(表 5)。しかしながら、体細胞クローン胚の発育率は、40%GLY グループで 30% GLY+10% EG と 20% GLY+20% EG グループより高い傾向があった。IVF 胚の発育率は、30% GLY+10% EG と 20% GLY+20% EG において、ガラス化保存しなかったものに比べ有意に低かった($P<0.05$)。さらに、ガラス化保存後の体細胞クローン胚の発育率はガラス化保存されなかった新鮮胚と比べ、有意に低かった($P<0.05$)。

考察

凍結保護物質として GLY と EG の組成はストロー内希釈後の胚の生存性に影響を与えなかった。融解後のストローを垂直に保つことで凍結保護物質の希釈は可能であり、融解後のストローを 1 分間垂直に保持することで、ストロー中の凍結保護物質は、その高い比重により下部のシヨ糖層と混合した。凍結保護物質は 1 分以内にガラス化液の組成に関わらず、シヨ糖液と完全混合された。しかしながら、この方法は、ストロー中のガラス化液が空気層によってシヨ糖液と分けられていないため、液体窒素に投入する前にガラス化液とシヨ糖液が混合するのを防ぐ必要があり、そのためにグリセロールなどの粘性のある凍結保護物質が必要であった。予備試験において、30%以上の EG を含むガラス化液ではガラス化処理以前にシヨ糖液とガラス化液が混合する傾向がみられた。さらに、20%未満の EG を含んでいるガラス化液のものと比べて、10% GLY+30% EG と 40% EG でガラス化保存された IVF 胚の生存率は有意に減少した(それぞれ 16/54、 $30.3\pm 4.2\%$ 、および 10/50、19.3

±4.7%)。これらの結果は、ストロー内希釈法においてストローを液体窒素に投入する前のガラス化液とショ糖液の混合防ぐために、粘性のある凍結保護物質を必要とすることを示唆していることから、本研究では、GLYとEG が20%以下の組み合わせで、粘性を維持し、ガラス化保存後のIVF胚とSCNT胚の生存率を評価した。

透過性の異なる2つの凍結保護物質をガラス化液に使用することで、それぞれの凍結保護物質の濃度を低くすることができる。ウシ胚はGLYよりEGに透過性があることが示されているが、EGはGLYより毒性が強い[24, 55]。そこで、EGとGLYを組み合わせることで、それぞれの凍結保護物質の毒性だけではなく、EGが細胞から急速に拡散することによる融解時の浸透圧損害も下げることが期待された。しかしながら、本研究結果は、ガラス化保存後のIVF胚の生存率と発育率において有意差がみられなかった。これらの結果は、EGとGLYの組み合わせによるガラス化保存法をダイレクト受精卵移植に応用する場合、ガラス化液の組成がガラス化保存後の生存率に有意な影響を与えないことを示した。一方、体細胞クローン胚はその作出段階において、透明帯が顕微操作により一部失われているため、IVF胚より凍結融解による傷害に鋭敏である[34, 56, 57]。本研究では、IVF胚において、ガラス化液の組成による差はみられなかったのに対し、体細胞クローン胚では、40% GLYでガラス化保存された胚の方が30% GLY+10% EGか20% GLY+20% EGを用いたものに比べ発育率が高くなる傾向がみられた。これらの結果は、凍結融解による傷害の感受性の高い体細胞クローン胚がガラス化保存後の胚の生存率でEGとGLYの組成による影響を明確化できることを示唆している。本研究では、体細胞クローン胚を40% GLY液でガラス化保存したときの生存率は、同じガラス化液でIVF胚を保存融解したときの生存率と同様の結果となった。これは、ダイレクト移植のために凍結保護物質をストロー内で希釈したとき、体細胞クローン胚が凍結保存後も体外受精胚と同様に生存性を維持できることを示すものと推察された。

以上のことから、GLYを含んでいるガラス化液へのEGの追加はガラス化保存後にスト

ロー内希釈されたIVF胚と体細胞クローン胚の生存率と発育率に影響を与えなかった。ガラス化保存されたIVF胚と体細胞クローン胚の生存率は新鮮胚に比べて減少した。しかしながら、融解後にストローを垂直・水平に保持するだけの方法が非常に簡単であることから、野外におけるガラス化保存胚のダイレクト移植に応用することが可能であることが示唆された。

第4章

総括

腔内挿入型プロジェステロン製剤で処置した肉用経産牛[8]、乳用未經産牛[4, 7]および経産牛[3]において、エストラジオールを投与することにより主席卵胞の発育を抑制し、その後、新しい卵胞波が出現する。プロジェステロン処置したウシにEBを投与した時、血漿エストラジオール濃度はその投与量にかかわらず、投与後12-24時間でピークを示し、96時間で基底値に戻ることを示されている[3, 58, 59]。この血漿中エストラジオール濃度の上昇により、血中FSH濃度は減少し、その後血漿中エストラジオール濃度が低下することによって血中FSH濃度は上昇しはじめる[37]。Martinez et al.[59]は、EB投与後、血中FSH濃度は12時間以内に減少し24時間で基底値を示し、60時間以内に再上昇することを示している。さらに、新しい卵胞波の出現がFSHサージの1日後に認められている[9, 58, 60]。本研究において、腔内挿入型プロジェステロン製剤を用いることなく、プロジェステロンの筋肉内投与により血漿中プロジェステロン濃度を上昇・維持したが、プログラム開始後、すべての試験区で主席卵胞の発育が抑制され、平均3.2日から3.8日の範囲で新しい卵胞波が出現した。これらのことより、プロジェステロンの筋肉内投与によるプログラムにおいても、EBを併用することにより、卵胞の発育を抑制し、新しい卵胞波が出現することが示唆された。

一方、Day17からプログラムを開始したグループにおいて、全頭が2度目のEB投与前に発情徴候が認められ、発情を同期化することができなかった。黄体後期もしくは発情前期の未經産牛に腔内挿入型プロジェステロン製剤とEBによる処置した場合、LHパルス頻度が黄体期レベルと卵胞期レベルの中間程度であり、主席卵胞は排卵または退行することなく長期に渡って維持されることが報告されている[61, 62]。しかしながら本研究において、Day17から開始したグループの全頭で、主席卵胞の退行が認められ、新しい卵胞波の出現が観察された。さらに、Day5およびDay12グループの新しく出現した卵胞波

の主席卵胞に比較して、Day17 グループの主席卵胞は発育速度が速く、プログラム開始後8日目に、全頭で直径 10mm 以上の主席卵胞が存在していた。一方、2 度目の EB 投与時における Day5 グループの黄体の平均直径は 15.0 mm で、他のグループと比較して有意に大きい値を示した。さらに、EB 投与時の血漿中プロゲステロン濃度も 7.3 ng/mL と高い値を示し、EB 投与後、全頭で 48 時間以内に発情徴候および排卵が観察された。Rich et al. [63]は、血中プロゲステロン濃度の推移から合成ジェスタージェン製剤処置時のエストラジオール投与効果を検討し、その結果、エストロジェン投与により黄体退行が促進されることを示した。本研究において、Day17からプログラムを開始したグループにおいて EB 投与前の発情徴候の発現を観察したが、これは新しい卵胞波の出現時期に機能黄体が存在せず血漿中プロゲステロン濃度の低下による LH パルス頻度の抑制が減少し、卵胞発育が促進されたためであると推察された。一方、新しい卵胞波の出現時に機能黄体の存在する Day5 グループにおいては、2度目のエストラジオール投与により、黄体退行が促進され、血漿中プロゲステロン濃度の減少とともに、LH パルス頻度が上昇し発情・排卵が誘起されたものと考えられた。

Day17からプログラムを開始したグループにおいて2回目のEB投与前に発情徴候が早く発現することが判明したため、プログラム開始から2回目のEB投与までの間隔を12日から10日に短縮し、また泌乳牛への処置であることを考慮し、プロゲステロン製剤を肝臓で代謝を受けやすいプロゲステロン水性懸濁注射液から、持続性黄体ホルモン製剤に変更した追加試験を行った(未提示)。しかしこの改良プログラムでは、乳用経産牛の発情発現率(12.9%)は未經産牛の発情発現率(91.7%)に比較して有意に低かった。経産牛では、分娩後の負のエネルギーバランスがLHパルス頻度の減少、主席卵胞の成長率や直径の減少に関連しているという報告があり[64]、また、Sangsrivong et al. [65]は、高泌乳により乾物摂取量が増加し、消化管、肝臓の循環血液量が増加することにより、肝臓でのエストラジオールの代謝クリアランスが上昇し、血中エストラジオール濃度は減少

する傾向があることを示している。これらのことより、未経産牛に比較して経産牛の発情発現率が低下したと考えられた。一方、人工授精後の受胎率は、発情徴候がみられた経産牛で50.0%、未経産牛で41.7%の値が得られたが、発情徴候のみられなかったウシの受胎率は18.5%以下であった。本研究において、発情徴候が認められたウシにはam-pm法により適期に人工授精が行われたと推定されたが、発情徴候の認められない場合には、定時授精を行っており、人工授精が適期でなかったために低い受胎率の結果になったと考えられた。しかし、プログラム開始後の卵胞波、血漿中プロゲステロン濃度を測定していないため、本プログラムにより新卵胞波の出現が同期化されたかどうか不明であり、今後の検討が必要と考えられた。

以上のことから、交雑種牛においてプロゲステロンとエストラジオールの筋肉内投与により、主席卵胞の発育を抑制し、平均3.2日から3.8日後に新しい卵胞波の出現を誘起できることが示された。しかしながら、発情周期の後期からプログラムを開始した場合、発情発現が早期に起こり、発情同期化することができないことが判明した。また、乳用経産牛では、本プログラムによる発情発現率は低く、受胎率もそれにともない低下する傾向であった。これらのことから、発情同期化率を高めるために、投与するプロゲステロンおよびエストラジオールの濃度、E/PとEBの投与間隔等さらなる検討が必要であると考えられた。

分娩後の肉用繁殖種牛または黒毛和種雌牛に CIDR を処置することにより、早期に発情を誘起できることが報告されている [46, 47]。本研究においても CIDR、PG F₂α の併用により分娩後早期に明瞭な発情を誘起することができ、分娩後 3 回目の排卵日を 10 日間短縮できることが明らかとなった。一方、対照群における妊娠側子宮角直径の変動は既報のものと同様であった [10]。排卵ごとの子宮角直径において試験群と対照群の間に差は認められなかったが、分娩後 31 日目における子宮角直径は、対照群の方が有意に大きいことが明らかとなった。これらのことから、分娩後の子宮角直径の減少は排卵回数

の影響を受けることが示唆された。

CIDR による発情誘起後に過剰排卵処置を行った試験群の胚回収成績は、無処置の対照群と差がなく、さらに、両群とも既報の胚回収成績[48, 49] と同等の移植可能胚率および凍結可能胚率であった。しかしながら、胚回収後の試験群の人工授精回数は 2.2 回と、対照群(1.3 回)より多くなり、受胎に要した日数が平均 86.2 日で、対照(70.0 日)に比較して約 16 日延長した。さらに分娩間隔も、目標とした 365 日を超える平均 371.2 日となった。この分娩間隔の延長は、胚回収後の初回発情で全頭が不受胎であったことによるものと考えられた。一方、実験 1 では CIDR 抜去後 2 日後に全頭が発情したが、実験 2 では 2 日から 6 日とバラツキが見られた。また、胚回収後の初回発情も、予想した 7 日後よりも遅く、8 日から 11 日後に観察された。このように CIDR 処置後および胚回収後の発情発現のバラツキが分娩間隔の延長の原因の 1 つと思われた。これらのことから、1 年 1 産 1 回胚回収が可能なプログラムを確立するためには、胚回収後の人工授精による受胎率の向上と、発情発現のバラツキを抑えるための正確な発情同期化方法を確立する必要があると思われた。

本研究において、分娩後 20 日目から CIDR 処置を行うことにより、分娩後早期に発情を誘起し、分娩後 3 回目の排卵日を短縮できることが判明した。さらに、その発情を起点とした過剰排卵処置によって胚回収を行った結果、無処置の対照群と同等の胚回収成績を得ることが明らかとなった。胚回収後の初回発情での低受胎率を向上させることにより、胚回収を含む計画的な 1 年 1 産が可能であることが示唆された。

牛胚の凍結保存に用いる凍結保護物質として GLY と EG の組成はストロー内希釈の後の胚の生存性に影響を与えなかった。ストローを震動させることなく、融解後に垂直に保つことで凍結保護物質のストロー内希釈は可能であった。融解後のストローを 1 分間、垂直に保持することで、ストロー中の凍結保護物質は、その高い比重により下部のショ糖層と混合した。凍結保護物質は 1 分以内にガラス化液の組成に関わらずショ糖液と完全混

合された。しかしながら、この方法は、ストローの中のガラス化液が空気層によってシヨ糖液と分けられていないため、液体窒素に投入する前にガラス化液とシヨ糖液が混合するのを防ぐ必要があり、そのためにグリセロールなどの粘性のある凍結保護物質が必要となる。予備試験において、30%以上の EG を含むガラス化液ではガラス化処理以前にシヨ糖液とガラス化液が混合する傾向が見られた。さらに、20%以下の EG を含んでいるガラス化液のもの比べて、10% GLY+30% EG と 40% EG でガラス化保存された IVF 胚の生存率は有意に減少した。これらの結果は、ストローを液体窒素に投入する前のガラス化液とシヨ糖液の混合防ぐために、粘性のある凍結保護物質を必要とすることを示唆していた。

透過性の異なる 2 つの凍結保護物質をガラス化液に使用することで、それぞれの凍結保護物質の濃度を低くすることができる。ウシ胚が GLY より EG に透過性があることが示されているが、EG は GLY より毒性が強い[24, 55]。そこで、EG と GLY を組み合わせることで、それぞれの凍結保護物質の毒性だけではなく、EG が細胞から急速に拡散することによる融解時の浸透圧損害も下げることが示唆された。しかしながら、ガラス化保存後の IVF 胚の生存率と発育率において有意差は見られなかった。これらの結果は、EG と GLY の組み合わせによるガラス化保存法をダイレクト受精卵移植に応用する場合、ガラス化液の組成がガラス化保存後の生存率に影響を与えないことを示した。一方、体細胞クローン胚はその作出段階において、透明帯が顕微操作によって一部失われているため IVF 胚より凍結融解による傷害に鋭敏である[34, 56, 57]。本研究では、IVF 胚において、ガラス化液の組成による差は見られなかったのに対し、体細胞クローン胚では、40%GLY でガラス化保存、融解されたものの方が 30% GLY+10% EG か 20% GLY+20% EG を用いたものに比べ発育率が高くなる傾向が見られた。これらの結果は、凍結融解による傷害に対して感度の高い体細胞クローン胚のガラス化保存後の胚の生存率を評価することで EG と GLY の組成による影響を明確化できることを示唆した。本研究では、体細胞クローン胚を 40% GLY 液でガラス化保存したときの生存率が、同様のガラス化液で IVF 胚をガラス化保存したときの

生存率と同様の結果となった。これは、ダイレクト移植のために凍結保護物質をストロー内で希釈したとき、体細胞クローン胚が凍結保存後も体外受精胚と同様に生存性を維持できることを示すものと推察された。以上のことから、GLY を含んでいるガラス化液への EG の追加はガラス化保存後にストロー内希釈された IVF 胚と体細胞クローン胚の生存率と発育率に影響を与えなかった。ガラス化保存された IVF 胚と体細胞クローン胚の生存率は新鮮胚に比べて減少した。しかしながら、融解後にストローを垂直・水平に保持する方法が非常に簡単であることから、野外におけるガラス化保存胚のダイレクト移植に応用することが可能であることが示唆された。

本研究により、安息香酸エストラジオール(EB)とプロジェステロン(P)による発情同期化プログラムにおいて、処置開始時の発情周期に関係なく、EB/P 処置後に新規の卵泡波が出現することが示された。また、処置後の発情発現は、処置開始時の発情周期の影響を受けることが示唆されたが、低コストでの発情同期化が可能であることが明らかにされた。さらに、発情誘起処置により、計画的な分娩後の胚回収と人工授精による速やかな受胎が可能であり、胚回収を含む計画的な 1 年 1 産が可能であることが示唆された。また、今回開発したガラス化胚のダイレクト移植法は非常に簡便であり、野外での実用化に有効であると思われた。以上これら得られた結果は、牛繁殖経営の低コスト化および胚移植技術の効率化の一助になると考えられた。

図表

表1. 交雑種牛の各発情周期におけるEB/P処置後の卵胞波の動態と発情・排卵までの日数

	発情前期	発情中期	発情後期
	(Day 5)	(Day 12)	(Day 17)
主卵胞直径(mm)			
E/P処置時	10.0 ± 0.8	9.4 ± 0.7	9.6 ± 0.2
2度目のEB処置時	12.2 ± 0.6	15.6 ± 1.2	9.2 ± 3.8
黄体直径(mm)			
E/P処置時	22.6 ± 1.2	23.4 ± 0.7	20.8 ± 1.1
2度目のEB処置時	15.0 ± 0.3 ^a	8.8 ± 0.5 ^b	9.6 ± 1.0 ^b
EB/P処置後から新規卵胞波 が出現するまでの日数(日)* (範囲)	3.6 ± 0.2 (3-4)	3.8 ± 0.4 (3-5)	3.2 ± 0.6 (2-5)
2度目のEB処置後から 発情発現までの日数(日)* (範囲)	1.8 ± 0.2 ^a (1-2)	1.4 ± 0.2 ^a (1-2)	-1.4 ± 0.4 ^b (-3--1)
2度目のEB処置後から 排卵までの日数(日)* (範囲)	2.8 ± 0.2 ^a (2-3)	2.0 ± 0.4 ^a (1-3)	0.4 ± 0.4 ^b (-1-1)

*平均値±標準誤差

^{a,b} 異符号間に有意差あり (P<0.05)

表 2. 黒毛和種牛の分娩後における発情誘起が初回排卵およびその後の排卵までの日数と子宮角の直径に及ぼす影響*

供試頭数	初回排卵		第2回目排卵		第3回目排卵	
	分娩後日数	子宮角直径 (mm)	分娩後日数	子宮角直径 (mm)	分娩後日数 (mm)	子宮角直径 (mm)
対照群 5	11.2 ± 0.4	94.6 ± 2.3	23.6 ± 1.3 ^a	67.8 ± 2.5	42.0 ± 1.1 ^a	49.8 ± 1.5
試験群** 5	10.2 ± 0.8	98.4 ± 4.0	20.0 ± 0.3 ^b	61.8 ± 1.4	31.6 ± 0.3 ^b	49.8 ± 1.6

* 平均値±標準誤差

** 分娩後 20 日目からプロジェステロン放出腔内挿入剤とプロスタグランジン F_{2α} を用いて発情を誘起
a,b 異符号間に有意差あり (P<0.05)

表 3. 分娩後早期に発情誘起を行った黒毛和種牛における胚回収成績とその後の人工授精による受胎成績

	対照群	試験群
供試頭数	5	5
回収卵数*	25.0 ± 1.8	24.0 ± 5.4
移植可能胚率(胚数)*	67.1 ± 9.1 (16.2 ± 1.5)	67.9 ± 4.7 (16.0 ± 3.1)
凍結可能胚率(胚数)*	45.9 ± 10.1 (10.9 ± 1.8)	52.6 ± 5.0 (12.2 ± 2.4)
胚回収後初回発情発現日数	8.8±0.3	9.4±0.3
初回授精での受胎頭数	4	0
2回目授精での受胎頭数	1	4
3回目授精での受胎頭数	0	1
受胎までの人工授精回数*	1.3 ± 0.3 ^a	2.2 ± 0.2 ^b
空胎日数*	70.0 ± 6.2	86.2 ± 3.8
分娩間隔日数*	355.0 ± 6.2	371.2 ± 3.8

*平均値±標準誤差

^{a,b} 異符号間に有意差あり (P<0.05)

表 4. ガラス化保存後の牛体外受精胚の生存率と発育率*

ガラス化液組成	供試胚数	生存胚率** (No.)***	発育胚率** (No.)****
40% GLY	55	74.2 ± 6.6 (40)	33.1 ± 3.2 (18) ^{ab}
30% GLY + 10% EG	55	63.7 ± 9.5 (36)	29.5 ± 8.6 (18) ^a
20% GLY + 20% EG	55	59.0 ± 8.1 (31)	24.2 ± 13.1 (11) ^a
対照群****	65	-	57.0 ± 6.7 (40) ^b

* 5 日間液体窒素内で保存

** 平均値 ± 標準誤差

*** 融解後、48 時間体外培養し、卵割腔の再拡大に基づいて評価

**** 融解後、72 時間体外培養し、胚盤胞の脱出に基づいて評価

***** ガラス化保存なしで体外培養

^{a,b} 異符号間に有意差あり (P<0.05)

表5. ガラス化保存後の牛クローン胚の生存率と発育率*

ガラス化液組成	供試胚数	生存胚率** (No.)***	発育胚率** (No.)****
40% GLY	23	76.4 ± 9.9 (18)	26.1 ± 11.5 (6) ^a
30% GLY + 10% EG	22	71.8 ± 11.4 (16)	7.1 ± 7.1 (2) ^a
20% GLY + 20% EG	22	50.3 ± 17.0 (11)	8.6 ± 5.1 (2) ^a
対照群****	22	-	68.9 ± 17.4 (12) ^b

* 5 日間液体窒素内で保存

** 平均値 ± 標準誤差

*** 融解後、48 時間体外培養し、卵割腔の再拡大に基づいて評価

**** 融解後、72 時間体外培養し、胚盤胞の脱出に基づいて評価

***** ガラス化保存なしで体外培養

^{a,b} 異符号間に有意差あり (P<0.05)

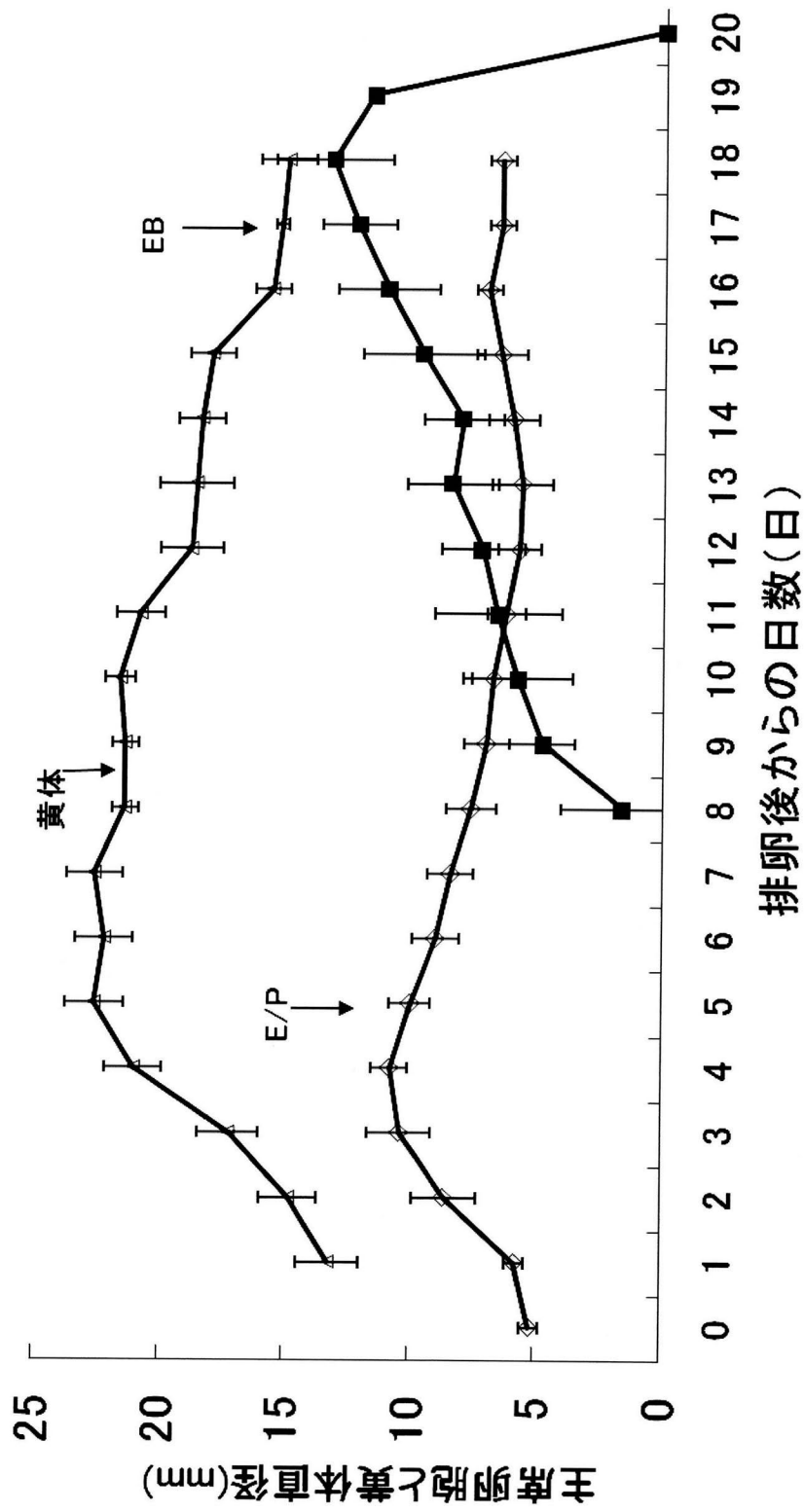


図1. Day5 試験区における主席卵胞と黄体の動態 (平均値±標準誤差)
 Day5 に EB2mg、水性 P200mg、Day17 に EB1mg を筋肉内投与

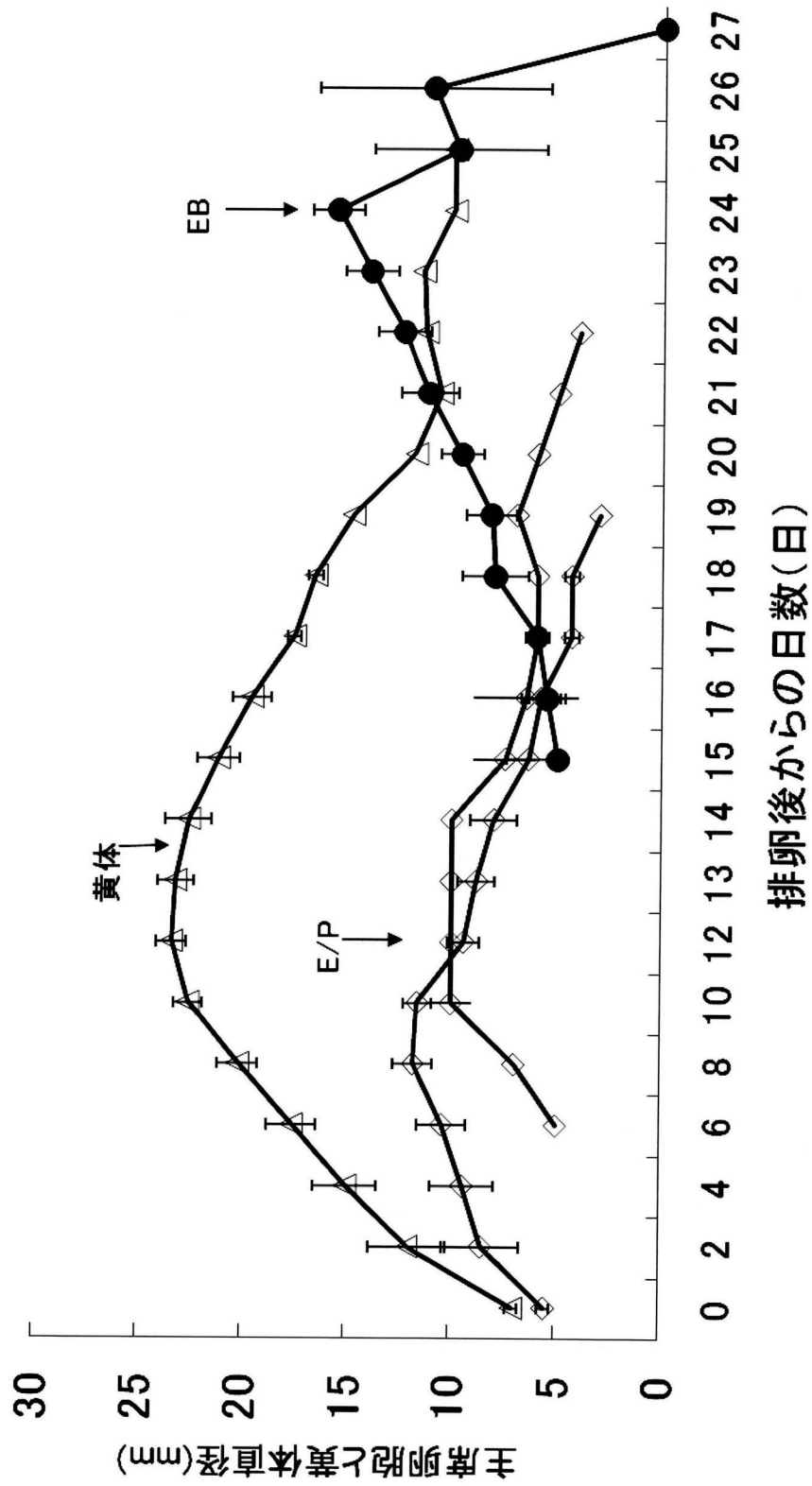


図2. Day12 試験区における主席卵胞と黄体の動態 (平均値±標準誤差)
 Day12 に EB2mg、水性 P200mg、Day24 に EB1mg を筋肉内投与

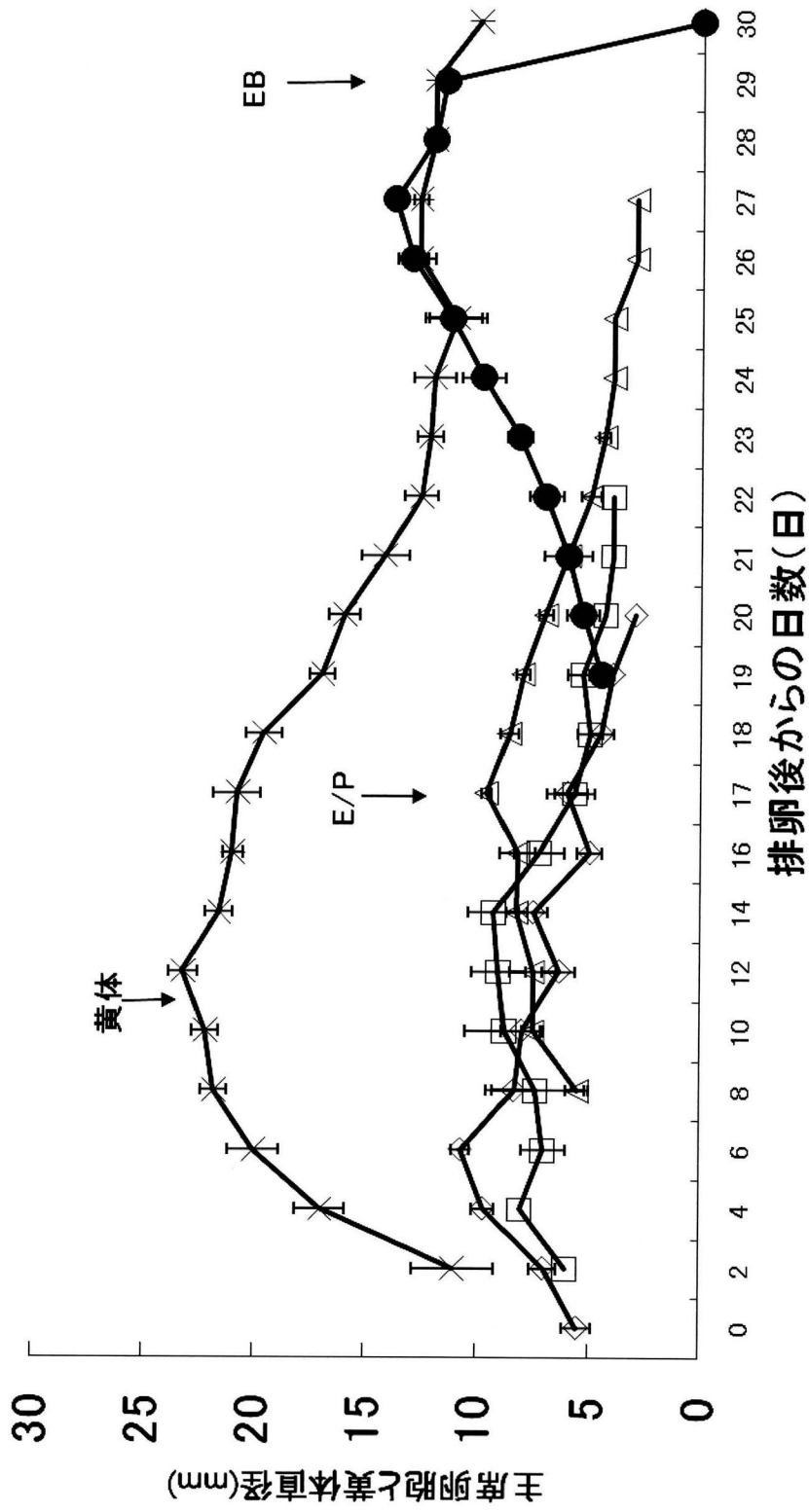


図3. Day17 試験区における主席卵胞と黄体の動態 (平均値±標準誤差)
 Day17 に EB2mg、水性 P200mg、Day29 に EB1mg を筋肉内投与

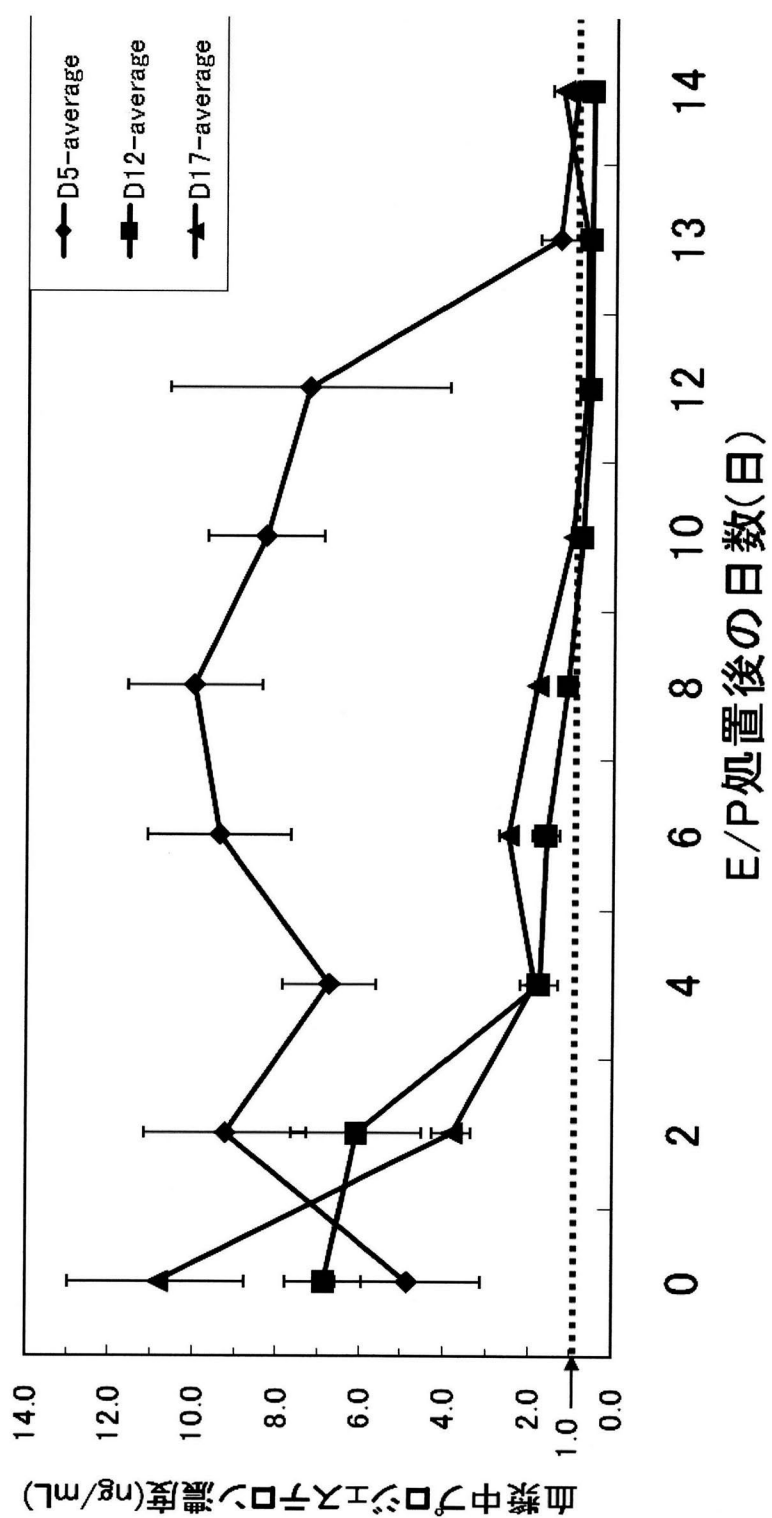
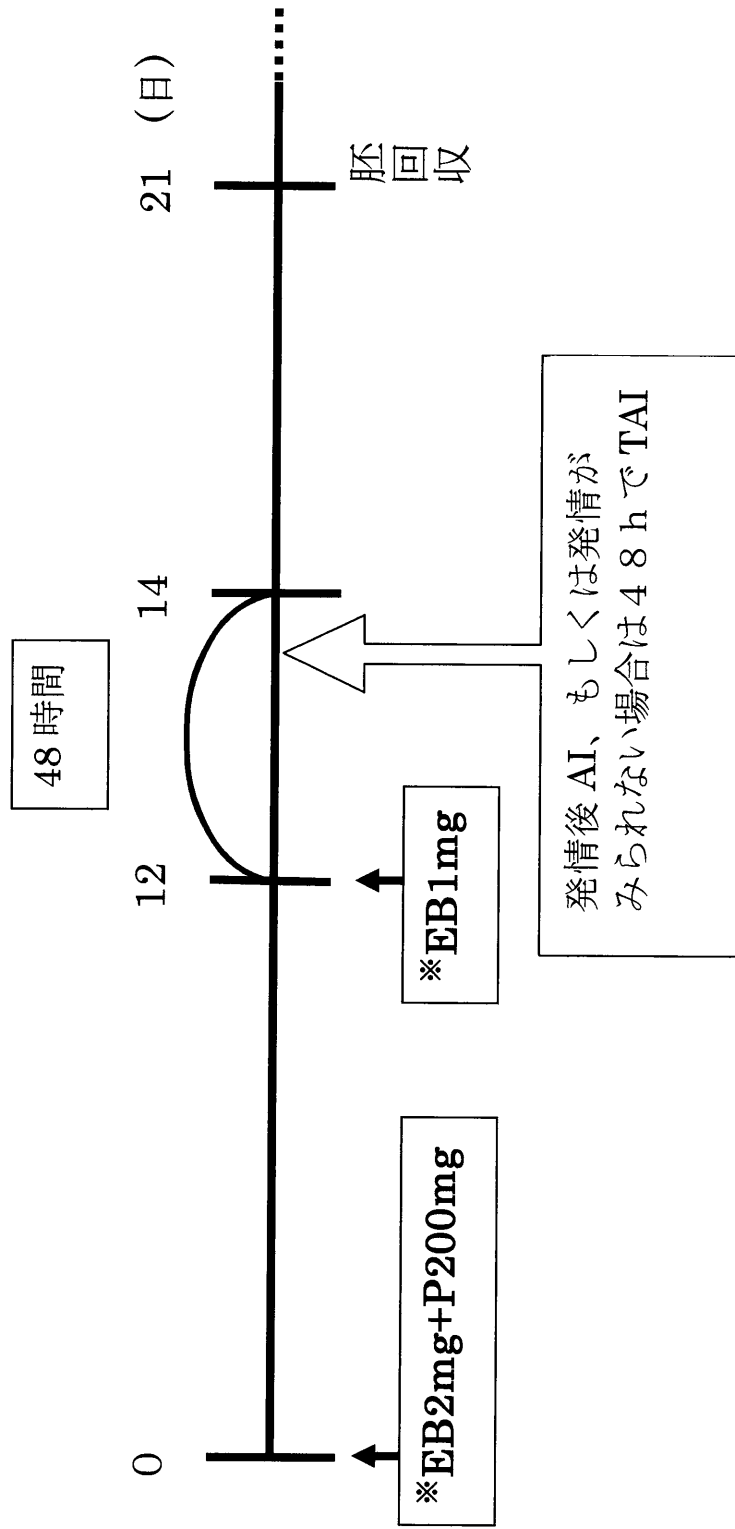


図4. 各試験区における血漿中プロジェステロン濃度の変動(平均値±標準誤差)
 0日目にEB2mg、水性P200mg、12日目にEB1mgを筋肉内投与

図5 実験1における発情同期化プログラム



※ EB ; 安息香酸エストラジオール、P ; プロゲステロン水性懸濁注射液

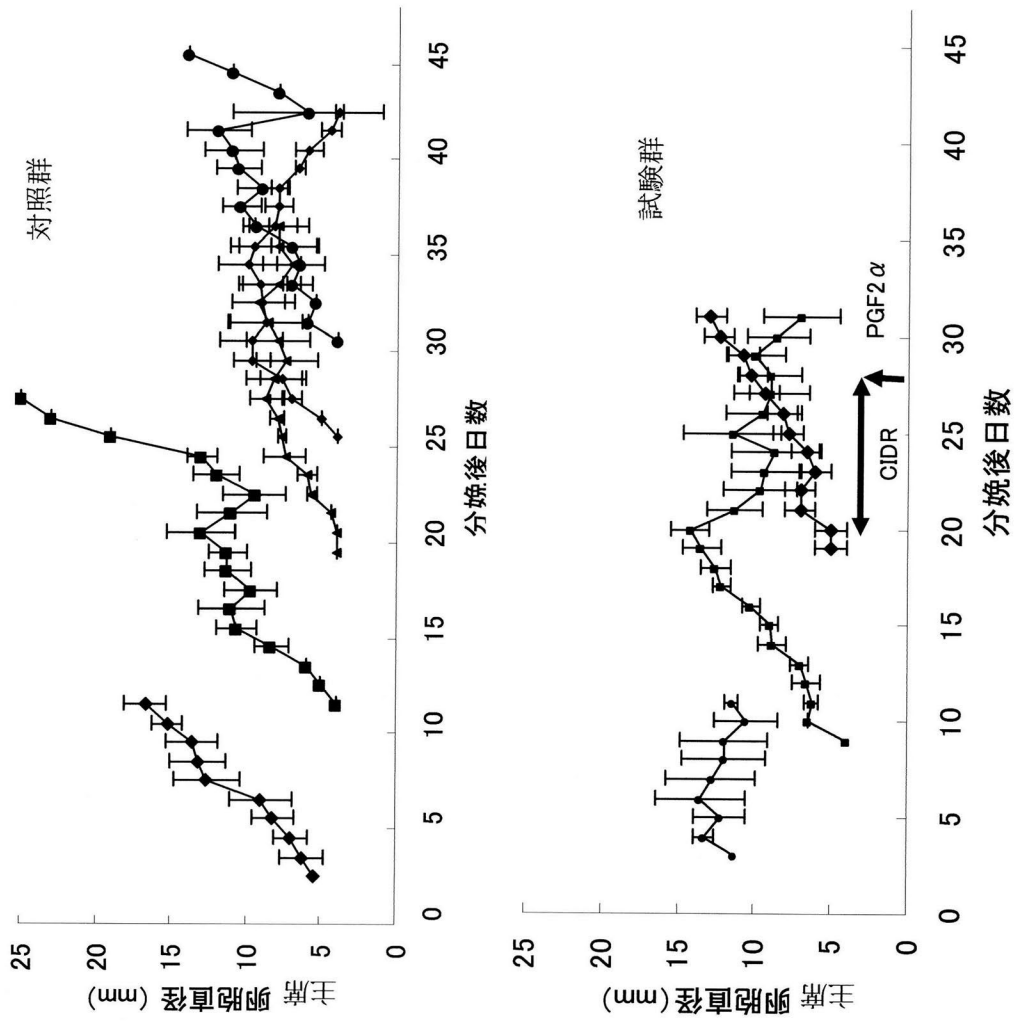


図 6. 分娩後早期に発情誘起処置を行った黒毛和種牛における主席卵胞直径の変動
(平均値±標準誤差)

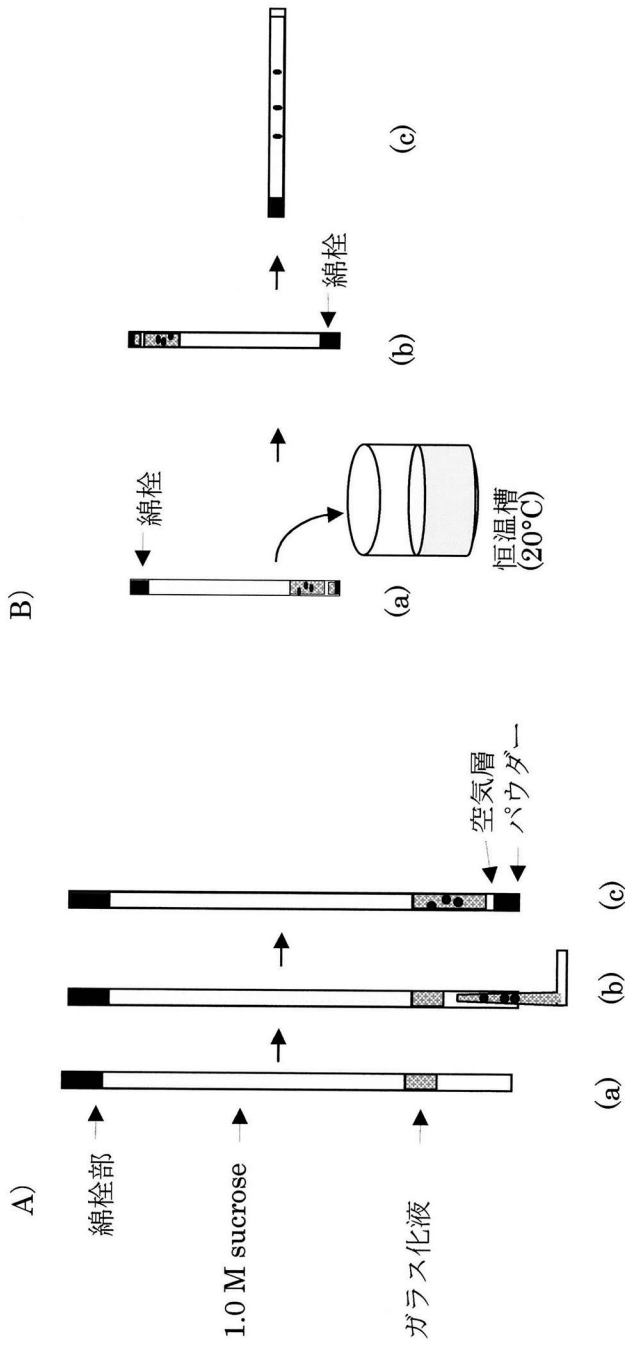


図7. 胚のガラス化保存と融解、ストロー内希釈手順

A) ストロー充填法 (a) 1 M sucrose を含む TCM-199 液を充填した後(約 8.0 cm)、ガラス化液を含むガラス化液(30 μ L)を、ガラスヒペットを用いて充填。(c) 胚を含むガラス化液の層から約 0.1cm 空気層を挟み、パウダーを用いて栓をした。

B) 凍結保護物質のストロー内希釈法 (a) ストローを垂直に保持して 20°Cの水に TCM-199 液が融解するまで投入。(約 10 秒) (b)凍結保護物質と sucrose 液を混合するため、ストローを逆さにして垂直に保持。(約 1 分) (c) 粉栓を切り落とした後、凍結保護物質の希釈のため、5 分間ストローを水平に保持。

謝 辞

本稿を終了するにあたり、各研究についてご指導とご助言を賜りました、山口大学大学院連合獣医学研究科 音井威重教授、宮崎大学農学部獣医学科 上村俊一教授、山口大学農学部獣医学科 中尾敏彦教授、田浦保穂教授、佐藤宏准教授に心から感謝申し上げます。

また、論文の作成にあたり貴重なご助言をいただきました独立行政法人草地畜産研究所 永井卓先生に深謝いたします。

参考文献

1. Bo GA, Adams GP, Pierson RA, Mapletoft RJ. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology* 1995; 43: 31-40.
2. Cavalieri J, Hepworth G, Parker KI, Wright PJ, Macmillan KL. Effect of treatment with progesterone and oestradiol when starting treatment with an intravaginal progesterone releasing insert on ovarian follicular development and hormonal concentrations in Holstein cows. *Anim Reprod Sci* 2003; 76: 177-193.
3. Martinez MF, Kastelic JP, Bo GA, Caccia M, Mapletoft RJ. Effects of oestradiol and some of its esters on gonadotrophin release and ovarian follicular dynamics in CIDR-treated beef cattle. *Anim Reprod Sci* 2005; 86: 37-52.
4. Bo GA, Adams GP, Pierson RA, Tribulo HE, Caccia M, Mapletoft RJ. Follicular wave dynamics after estradiol-17 β treatment of heifers with or without a progestogen implant. *Theriogenology* 1994; 41: 1555-1569.
5. Price CA, Webb R. Steroid control of gonadotropin secretion and ovarian function in heifers. *Endocrinology* 1988; 122: 2222-2231.
6. O'Rourke M, Diskin MG, Sreenan JM, Roche JF. The effect of dose and route of oestradiol benzoate administration on plasma concentrations of oestradiol and FSH in long-term ovariectomised heifers. *Anim Reprod Sci* 2000; 59: 1-12.
7. Bo GA, Adams GP, Caccia M, Martinez M, Pierson RA, Mapletoft RJ. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. *Anim Reprod Sci* 1995; 39: 193-204.

8. Roche JF, Austin EJ, Ryan M, O'Rourke M, Mihm M, Diskin MG. Regulation of follicle waves to maximize fertility in cattle. *J Reprod Fertil Suppl* 1999; 54: 61-71.
9. Colazo MG, Martinez MF, Small JA, Kastelic JP, Burnley CA, Ward DR, Mapletoft RJ. Effect of estradiol valerate on ovarian follicle dynamics and superovulatory response in progestin-treated cattle. *Theriogenology* 2005; 63: 1454-1468.
10. Nakano K. 1999.
11. Butler WR, Everett RW, Coppock CE. The relationships between energy balance, milk production and ovulation in postpartum Holstein cows. *J Anim Sci* 1981; 53: 742-748.
12. Murphy MG, Boland MP, Roche JF. Pattern of follicular growth and resumption of ovarian activity in post-partum beef suckler cows. *J Reprod Fertil* 1990; 90: 523-533.
13. Stagg K, Diskin MG, Sreenan JM, Roche JF. Follicular development in long-term anoestrous suckler beef cows fed two levels of energy postpartum. *Anim Reprod Sci* 1995; 49-61.
14. Archbald LF, Tsai IF, Thatcher WW, Tran T, Wolfsdorf K, Risco C. Use of plasma concentrations of 13,14-dihydro,15-keto-PGF₂ alpha (PGFM) in the diagnosis of sub-clinical endometritis and its relationship to fertility in the postpartum dairy cow. *Theriogenology* 1998; 49: 1425-1436.
15. Bastidas P, Troconiz J, Verde O, Silva O. Effect of restricted suckling on pregnancy rates and calf performance in Brahman cows. *Theriogenology* 1984; 21: 289-294.
16. Okano A, Tomizuka T. Ultrasonic observation of postpartum uterine involution in the cow. *Theriogenology* 1987; 27: 369-376.
17. Cognie Y, Baril G, Poulin N, Mermillod P. Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology* 2003; 59: 171-188.

18. Hasler JF. The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. *Anim Reprod Sci* 2003; 79: 245-264.
19. Niemann H, Rath D. Progress in reproductive biotechnology in swine. *Theriogenology* 2001; 56: 1291-1304.
20. Squires EL, Carnevale EM, McCue PM, Bruemmer JE. Embryo technologies in the horse. *Theriogenology* 2003; 59: 151-170.
21. Galli C, Duchi R, Crotti G, Turini P, Ponderato N, Colleoni S, Lagutina I, Lazzari G. Production and quality of bovine oocytes and embryos. *Vet Res Commun* 2004; 28 Suppl 1: 121-126.
22. Dinnyes A, Dai Y, Jiang S, Yang X. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod* 2000; 63: 513-518.
23. Vajta G, Hyttel P, Callesen H. Morphological changes of in-vitro-produced bovine blastocysts after vitrification, in-straw direct rehydration, and culture. *Mol Reprod Dev* 1997; 48: 9-17.
24. Tachikawa S, Otoi T, Kondo S, Machida T, Kasai M. Successful vitrification of bovine blastocysts, derived by in vitro maturation and fertilization. *Mol Reprod Dev* 1993; 34: 266-271.
25. Xu J, Guo Z, Su L, Nedambale TL, Zhang J, Schenk J, Moreno JF, Dinnyes A, Ji W, Tian XC, Yang X, Du F. Developmental potential of vitrified holstein cattle embryos fertilized in vitro with sex-sorted sperm. *J Dairy Sci* 2006; 89: 2510-2518.
26. Nedambale TL, Dinnyes A, Yang X, Tian XC. Bovine blastocyst development in vitro: timing, sex, and viability following vitrification. *Biol Reprod* 2004; 71: 1671-1676.

27. Leibo SP. A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology* 1984; 21: 767-790.
28. Dochi O, Yamamoto Y, Saga H, Yoshiba N, Kano N, Maeda J, Miyata K, Yamauchi A, Tominaga K, Oda Y, Nakashima T, Inohae S. Direct transfer of bovine embryos frozen-thawed in the presence of propylene glycol or ethylene glycol under on-farm conditions in an integrated embryo transfer program. *Theriogenology* 1998; 49: 1051-1058.
29. Voelkel SA, Hu YX. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology* 1992; 37: 23-37.
30. Vajta G, Kuwayama M. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology* 2006; 65: 236-244.
31. Vajta G, Murphy CN, Machaty Z, Prather RS, Greve T, Callesen H. In-straw dilution of bovine blastocysts after vitrification with the open-pulled straw method. *Vet Rec* 1999; 144: 180-181.
32. Tecirlioglu RT, French AJ, Lewis IM, Vajta G, Korfiatis NA, Hall VJ, Ruddock NT, Cooney MA, Trounson AO. Birth of a cloned calf derived from a vitrified hand-made cloned embryo. *Reprod Fertil Dev* 2003; 15: 361-366.
33. Galli C, Duchi R, Crotti G, Turini P, Ponderato N, Colleoni S, Lagutina I, Lazzari G. Bovine embryo technologies. *Theriogenology* 2003; 59: 599-616.
34. Nguyen BX, Sotomaru Y, Tani T, Kato Y, Tsunoda Y. Efficient cryopreservation of bovine blastocysts derived from nuclear transfer with somatic cells using partial dehydration and vitrification. *Theriogenology* 2000; 53: 1439-1448.

35. Bo GA, Baruselli PS, Moreno D, Cutaia L, Caccia M, Tribulo R, Tribulo H, Mapletoft RJ. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology* 2002; 57: 53-72.
36. Ross PJ, Aller JF, Callejas SS, Butler H, Alberio RH. Estradiol benzoate given 0 or 24 h after the end of a progestagen treatment in postpartum suckled beef cows. *Theriogenology* 2004; 62: 265-273.
37. Perry RC, Corah LR, Kiracofe GH, Stevenson JS, Beal WE. Endocrine changes and ultrasonography of ovaries in suckled beef cows during resumption of postpartum estrous cycles. *J Anim Sci* 1991; 69: 2548-2555.
38. Moreno D, Cutaia L, Villata ML, Ortisi F, Bo GA. Follicle wave emergence in beef cows treated with progesterone releasing devices, estradiol benzoate and progesterone. *Theriogenology* 2001; 55: 408 abstr.
39. Roche JF. Control and regulation of folliculogenesis--a symposium in perspective. *Rev Reprod* 1996; 1: 19-27.
40. Manikkam M, Rajamahendran R. Progesterone induced atresia of proestrous dominant follicle in the bovine ovary: Changes in diameter, insulin-like growth factor system, aromatase activity, steroid hormones, and apoptotic index. *Biol. Reprod.* 1997; 57: 580-587.
41. Lucy MC, Savio JD, Badinga L, De La Sota RL, Thatcher WW. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J Anim Sci* 1992; 70: 3615-3626.
42. Kamimura S, Ohgi T, Takahashi M, Tsukamoto T. Postpartum resumption of ovarian activity and uterine involution monitored by ultrasonography in Holstein cows. *J Vet Med Sci* 1993; 55: 643-647.

43. Sheldon IM, Noakes DE, Rycroft AN, Dobson H. Effect of intrauterine administration of oestradiol on postpartum uterine bacterial infection in cattle. *Anim Reprod Sci* 2004; 81: 13-23.
44. Ramirez-Godinez JA, Kiracofe GH, McKee RM, Schalles RR, Kittok RJ. Reducing the incidence of short estrous cycles in beef cows with norgestomet. *Theriogenology* 1981; 15: 613-623.
45. Lindner GM, Wright RW. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology* 1983; 20: 407-416.
46. Lamb GC, Stevenson JS, Kesler DJ, Garverick HA, Brown DR, Salfen BE. Inclusion of an intravaginal progesterone insert plus GnRH and prostaglandin F2alpha for ovulation control in postpartum suckled beef cows. *J Anim Sci* 2001; 79: 2253-2259.
47. Kawate N, Itami T, Choushi T, Saitoh T, Wada T, Matsuoka K, Uenaka K, Tanaka N, Yamanaka A, Sakase M, Tamada H, Inaba T, Sawada T. Improved conception in timed-artificial insemination using a progesterone-releasing intravaginal device and Ovsynch protocol in postpartum suckled Japanese Black beef cows. *Theriogenology* 2004; 61: 399-406.
48. Otoi T, Koyama N, Yamamoto K, Tachikawa S, Suzuki T. Effect of removal of large follicles after artificial insemination on embryo yield of superovulated beef cows. *Can. J. Anim. Sci.* 2000; 80: 199-201.
49. Sugano M, Shinogi T, Nakada K, Nakao T. Endocrine profiles and embryo quality in Japanese black cattle superovulated with human menopausal gonadotrophin and porcine follicle stimulating hormone. *Reprod Domest Anim* 2001; 36: 57-63.

50. Mori M, Otoi T, Wongsrikeao P, Agung B, Nagai T. Effects of beta-mercaptoethanol and cycloheximide on survival and DNA damage of bovine embryos stored at 4 degrees C for 72 h. *Theriogenology* 2006; 65: 1322-1332.
51. Brackett BG, Oliphant G. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol. Reprod.* 1975; 12: 260-274.
52. Fahrudin M, Otoi T, Karja NW, Mori M, Murakami M, Suzuki T. Analysis of DNA fragmentation in bovine somatic nuclear transfer embryos using TUNEL. *Reproduction* 2002; 124: 813-819.
53. Kwun J, Chang K, Lim J, Lee E, Lee B, Kang S, Hwang W. Effects of exogenous hexoses on bovine in vitro fertilized and cloned embryo development: Improved blastocyst formation after glucose replacement with fructose in a serum-free culture medium. *Mol Reprod Dev* 2003; 65: 167-174.
54. Fischer-Brown A, Monson R, Parrish J, Rutledge J. Cell allocation in bovine embryos cultured in two media under two oxygen concentrations. *Zygote* 2002; 10: 341-348.
55. Szell A, Shelton JN, Szell K. Osmotic characteristics of sheep and cattle embryos. *Cryobiology* 1989; 26: 297-301.
56. Booth PJ, Vajta G, Holm P, Greve T, Callesen H. Post-thaw in vitro survival of vitrified cloned bovine embryos. *Vet Rec* 1997; 140: 404.
57. Takano H, Kozai C, Shimizu S, Kato Y, Tsunoda Y. Cloning of bovine embryos by multiple nuclear transfer. *Theriogenology* 1997; 47: 1365-1373.
58. Bo GA, Adams GP, Nasser LF, Pierson RA, Mapletoft RJ. Effect of estradiol valerate on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating gonadotropins in heifers. *Theriogenology* 1993; 40: 225-239.

59. Martinez MF, Colazo MG, Kastelic JP, Mapletoft RJ. Effect of estradiol and progesterone on plasma steroid and gonadotropin concentrations in CIDR-treated ovariectomized cows. *Theriogenology* 2003; 59: 224 Abstr.
60. Adams GP, Matteri RL, Ginther OJ. Effect of progesterone on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating follicle-stimulating hormone in heifers. *J Reprod Fertil* 1992; 96: 627-640.
61. Colazo MG, Kastelic JP, Mapletoft RJ. Effects of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular dynamics, synchrony of ovulation, and fertility in CIDR-based, fixed-time AI programs in beef heifers. *Theriogenology* 2003; 60: 855-865.
62. Martinez MF, Colazo MG, Kastelic JP, Mapletoft RJ. Effects of estradiol-17 β or estradiol benzoate on follicular dynamics in CIDR-B-treated beef heifers. *Theriogenology* 2002; 57: 382 Abstr.
63. Rich TD, Johnson CL, Randel RD. Plasma LH, progestins and corticoids in heifers injected with estradiol valerate and FSH during estrous synchronization with MGA. *J Anim Sci* 1972; 35: 90-96.
64. Roche JF, Mackey D, Diskin MD. Reproductive management of postpartum cows. *Anim Reprod Sci* 2000; 60-61: 703-712.
65. Sangsritavong S, Combs DK, Sartori R, Armentano LE, Wiltbank MC. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17 β in dairy cattle. *J Dairy Sci* 2002; 85: 2831-2842.