

効率的な双子生産技術の確立

Establishment of Efficient Twin Calving Technology

梅木英伸¹⁾

要 旨

本試験は、繁殖農家における飼養雌牛の、1 頭当たりの子牛生産頭数の増大を図ることを目的としている。今回は、血清を添加していない Polyvinyl alcohol (以下 PVA) -SOF 発生培養液への、epidermal growth factor (以下 EGF)、insulin-like growth factor- (以下 IGF-)、グルコースの添加が、牛体外胚の胚盤胞発生率に及ぼす影響について検討した。

- 1 . PVA-SOF に EGF を 1 ~ 200ng/ml 添加した結果、7、8 日目の胚盤胞発生率は、0 添加区 (7 日目 13.8 %、8 日目 18.1 %) と比較して、各添加区 (7 日目 20.0 ~ 25.8 %、8 日目 33.7 ~ 39.4 %) の胚盤胞発生率は高い傾向 ($P < 0.1$) を示したが、EGF 添加による細胞数の増加は認めなかった。
- 2 . PVA-SOF に IGF- を 0 ~ 100ng/ml 添加した結果、7、8 日目の胚盤胞発生率において、0 添加区 (7 日目 8.8 %、8 日目 15.4 %) と比較して 50ng/ml 添加区 (7 日目 20.7 %、8 日目 34.8 %)、100ng/ml 添加区 (7 日目 20.4 %、8 日目 29.0 %) で有意に高い ($P < 0.05$) 発生率を示したが、IGF- 添加による細胞数の増加は認めなかった。
- 3 . EGF100ng/ml、IGF- 50ng/ml、グルコース 0 ~ 5.6mM を PVA-SOF に同時添加した結果、桑実胚率、7、8 日目の胚盤胞発生率において、グルコース濃度が高くなるに従い発生率が低下した。またグルコース 1.5mM 添加区は 4.0mM、5.6mM 添加区と比較して有意に高い ($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$) 桑実胚率 (37.0 %)、7、8、9 日目の胚盤胞発生率 (7 日目 20.7 %、8 日目 27.2 %、9 日目 28.3 %) を示した。
- 4 . EGF、IGF- を添加した PVA-SOF に、グルコースの添加量を 1.5mM、4.0mM、添加時期を 0 日目、3 日目、6 日目にして試験した結果、9 日目の胚盤胞発生率において、グルコースを 6 日目に 4.0mM 添加した区は、43.8 % であり他の添加区と比較して有意に高い ($P < 0.05$) 胚盤胞発生率を示した。

以上のことから、血清を添加していない PVA-SOF 発生培養液に、EGF100ng/ml、IGF- 50ng/ml を同時添加し、発生培養開始後の 6 日目からグルコース 4.0mM 添加することによって、血清添加の発生培養液と比較して遜色のない発生成績を得ることができた。この手法を利用することで経腔採卵 (ovum pick up: 以下 OPU)、体外受精 (In vitro fertilization: 以下 IVF) 技術による体外胚生産の向上が図られ、優良形質を持つ雌牛の産子を効率的に増頭することが可能となると考えられた。

(キーワード: EGF、IGF-、グルコース、細胞数、胚盤胞発生率)

背景及び目的

近年、優良遺伝子を持つ肉用牛の効率的生産方法の新技术として、体細胞クローン牛の作出¹⁾が可能

となった。しかし、この技術が現場への普及技術として定着するには、この乳肉が食品として安全であるかを科学的データに基づいて明らかにし、消費者

1) 豊後大野家畜保健衛生所

が受け入れることが必要である。

一方、細胞分裂が進んだ胚からの分割²³⁾⁴⁾⁵⁾、割球分離⁶⁾技術による一卵性双子生産は技術的にある程度確立されているが、胚の分割、分離技術は技術的に困難で熟練が必要であり、また、分離された割球の発育や物理的に切断された胚の回復技術⁷⁾には更なる改良が必要と考えられる。他に、多胎生産を行う技術として、ホルモン製剤投与後に人工授精を実施し双子を生産する方法⁸⁾⁹⁾があるが、産子数をコントロールすることが難しいことから、現場への普及には至っていない。

そこで本試験は、優良遺伝子を保有する雌牛から効率的・安定的に双子生産を行うことで、繁殖農家における飼養雌牛の1頭当たりの子牛生産頭数の増大を図ることが経済効率の向上につながり、ひいては効率の良い肉資源の増産の一手段になりうると考えられることから、6～8細胞期胚の割球分割を行い、1胚から移植可能な3胚の胚盤胞期胚を作成し移植を行ったが受胎を確認できなかった¹⁰⁾。

Roberts¹¹⁾らは、割球には各々分割パターンがあり各々の割球は、分割時に最初に8細胞期に発育した細胞が内細胞塊、遅れて8細胞期に発育した細胞が栄養膜へ発育するため、4細胞期胚以降からの分割産子(3～4子)の生産は難しいと報告している。また、Willadsen⁶⁾らが4子の分割産子の生産した報告以降、他の分割胚による3子以上の生産報告は無いことから、割球分割操作技術による1胚からの双子以上の子牛生産を中止した。しかし、現時点において優良形質を持つ雌牛の産子を数多く生産できる技術としてOPU-IVFが最も有効であると考えられ、この技術を活用して県下の農家で飼養されている優良雌牛を用い胚の生産を行い、県下の多くの農家でこの胚を利用することで、効率的に優良牛の多数生産を行うことが可能であると思われるが、OPU-IVFは胚盤胞発生率が20～30%と低い¹²⁾ことや、血清添加によると考えられる過大児¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾等の解決しなければならない問題があり、IVF後の胚培養技術の更なる改善が必要である。

今回は、発生培養液に血清を添加せずに効率的に胚生産を行える培養液の作成を目的として、発生培

養液へEGF、IGF- およびグルコースを添加して、胚盤胞発生率、胚の品質の検討を行った。

なお、本試験は6県(神奈川、奈良、山口、高知、大分、宮崎)による共同試験で実施した当場の成績である。

材料及び方法

1. 食肉処理場からの卵子採取方法

食肉処理場で採取した卵巣を、約30℃に調整した生食水入りの保存瓶に入れ持ち帰り、20%非働化子牛血清+0.4%血清アルブミン(SIGMA)添加修正ダルベッコのPBS(以下m-PBS)を吸引した18G注射針付き食肉処理場卵巣吸引採取装置(Tama-Q、富士平)を用いて、2～5mm径の卵胞から卵胞液とともに卵子を吸引採取した。採取液をシャーレに移して鏡検しm-PBSに回収した。卵子は卵丘細胞の付着状態等によって以下の6段階¹²⁾の卵子グレードに分類した。

- G 1：透明帯の周囲を卵丘細胞が4層以上取り囲んでいる
- G 2：透明帯の周囲に卵丘細胞が1～3層(放線冠細胞も含む)付着している
- G 3：卵丘細胞が透明帯の周りに部分的(1/3以下)に付着している
- G 4：完全に裸化されている
- G 5：卵丘細胞が膨化している
- G 6：卵丘細胞の付着状態に拘わらず卵細胞質が変性している

以上の卵子グレードの分類より、G 1、G 2の採取卵子を供試卵子とした。

2. 卵子の成熟

卵子の成熟は0.02AU/ml FSH(アントリン、デンカ)と1μg/ml Estradiol-17β(SIGMA)および0.2mM ビルビン酸(SIGMA)を加えた5%非働化牛胎児血清(GIBCO)添加 TCM-199(GIBCO)で3回洗浄し、1胚当たり10μlの同培養液に卵子を移し、CO₂インキュベーター(38.9℃、5%CO₂、in air、湿潤)で20～22時間培養して卵子の成熟を促した。

3. 媒精

37℃温湯で凍結融解した黒毛和種精液をIVF100

(機能性ペプチド研)で2回遠心洗浄後(2,000rpm、6 min、38℃)精子濃度 1×10^7 /ml に調整した。50 μ l の精子浮遊液ドロップを作り、ミネラルオイルでカバーし、CO₂ インキュベーター内でガス平衡した。一方、成熟を促した卵子を IVF100 で洗浄後、先に準備した精子浮遊液ドロップに入れ最終精子濃度 5×10^6 /ml とし、CO₂ インキュベーター内で6時間媒精した。

4. 胚の培養

媒精終了後、基礎培地の 1 mg/ml PVA(SIGMA)-SOF⁶⁾に移し、ピペティングにより卵丘細胞の除去を行い、3回洗浄後、以下の試験方法で設定した発生培養液のドロップ(1胚/5 μ l)に移し、マルチインキュベーターで培養を行った(38.9℃、90% N₂、5% CO₂、5% O₂、湿潤)。

5. 試験方法

試験1：細胞分化を促進させ¹⁷⁾胚生産の向上に期待できる EGF を無血清発生培養液へ添加し、牛体外胚の発生に及ぼす影響を検討する。

EGF 0 添加区(無添加)、EGF 1ng/ml 添加区、EGF 10ng/ml 添加区、EGF 100ng/ml 添加区、EGF 200ng/ml 添加区の5つに区分し、適正な EGF 濃度を検討した。

試験2：胚発生において、アポトーシスを抑え¹⁸⁾胚生産の向上に期待できる IGF- を無血清発生培養液へ添加し、牛体外胚の発生に及ぼす影響を検討する。

IGF- 0 添加区(無添加)、IGF- 2ng/ml 添加区、IGF- 10ng/ml 添加区、IGF- 50ng/ml 添加区、IGF- 100ng/ml 添加区の5つに区分し、適正な IGF- 濃度を検討した。

試験3：試験1、試験2の結果に基づいて、適正な濃度の EGF、IGF- を PVA-SOF に同時添加し、牛胚の発育を促進するグルコース²⁰⁾を更に添加することで、牛体外胚の発生に及ぼすグルコース濃度の影響を検討する。

グルコース 0.2mM 添加区、グルコース 1.5mM 添加区、グルコース 2.0mM 添加区、グルコース 4.0mM 添加区、グルコース 5.6mM 添加区の5つに区分し、適正なグルコース濃度を検討した。

試験4：EGF、IGF- を添加した PVA-SOF に、試験3の結果から得た適正なグルコース添加濃度を基にして、牛体外胚の発生に適したグルコース添加時期について検討する。

グルコース 0 添加区(無添加)、グルコースを 0 日目(媒精日を 0 日目として)から 1.5mM 添加区、グルコースを 3 日目から 1.5mM 添加区、グルコースを 3 日目から 4.0mM 添加区、グルコースを 6 日目から 4.0mM 添加区の5つに区分し、適正なグルコース添加時期を検討した。

6. 胚の染色法

媒精日を 0 日目として、8 日目の胚盤胞および拡張胚盤胞を、阪谷ら²¹⁾の報告に準じて内部細胞塊(以下 ICM)を青色(Hoechst 33342)、栄養膜細胞(以下 TE)をピンク色(Propidium Iodide と Hoechst 33342)に染めて観察した。

7. 調査項目

- 1) 媒精日を 0 日目として 2 日目の分割率
- 2) 5 ~ 8 日目の桑実胚数、胚盤胞数
- 3) ICM と TE の細胞数

8. 統計処理

本試験の成績は、分散分析および Fisher's の PLSD テストにより有意差の評価を行い、危険率 5% (P < 0.05) 未満を有意差有りと判定した。また、% の値はアークサイン変換した後に検定を行った。

結果及び考察

試験1：PVA-SOF に EGF を 0 ~ 200ng/ml 添加した結果、卵割率、4cell 期胚率、桑実胚率は、0 添加区と各添加区(1 ~ 200ng/ml)の比較において差を認めなかった。また、6 ~ 8 日目の胚盤胞発生率は、0 添加区と各添加区を比較して差を認めなかったが、7、8 日目の 0 添加区(7 日目 13.8%、8 日目 18.1%)と各添加区間において、添加区(7 日目 20.0 ~ 25.8%、8 日目 33.7 ~ 39.4%)で胚盤胞発生率が高い傾向(P < 0.1)を示したことから、PVA-SOF への EGF 添加は、胚盤胞発生率を高める効果があると考えられた(表 1)。

体外受精後 8 日目の胚盤胞および拡張胚盤胞の細胞数は、EGF を添加した 200ng/ml 添加区は 100ng/ml

添加区と比較して有意(P<0.05)に ICM の細胞数が増加した。しかし、ICM と TE の合計の細胞数には差を認めなかったことから、PVA-SOF への EGF 添加によって、細胞数を増加させる効果はないと考えられた(表 2)。

これらのことから、本試験の 8 日目の胚盤胞発生率において EGF10ng/ml 添加区は 39.4 % で最も高い発生率を示したが、共同試験の成績において 200ng/ml 添加区は他の添加区より高い発生率を示している²³⁾ことから、これらの添加区と同等の発生率を示した中間添加量の 100ng/ml 添加区を適正添加量とした。

試験 2：PVA-SOF に IGF- を 0 ~ 100ng/ml 添加した結果、卵割率、4cell 期胚率、桑実胚率は、0 添加区と各添加区(2 ~ 100ng/ml)の比較において差を認めなかった。しかし、7、8 日目の胚盤胞発生率において、0 添加区(7 日目 8.8 %、8 日目 15.4

%)と比較して IGF- 添加量の高い 50ng/ml 添加区(7 日目 20.7 %、8 日目 34.8 %)、100ng/ml 添加区(7 日目 20.4 %、8 日目 29.0 %)で有意に高い(P<0.05)胚盤胞発生率を示したことから、PVA-SOF への IGF- 添加は、胚盤胞発生率を高める効果があると考えられた(表 3)。

体外受精後 8 日目の胚盤胞および拡張胚盤胞の細胞数は、0 添加区と各添加区間において、ICM の細胞数、TE の細胞数、ICM と TE 合計の細胞数に差を認めなかったことから、PVA-SOF への IGF- 添加によって、細胞数を増加させる効果はないと考えられた(表 4)。

これらのことから、本試験と共同試験²²⁾の結果のうち、8 日目の胚盤胞発生率において発生率の向上効果を認めた IGF- 50ng/ml 添加区を、適正添加量とした。

表1 EGF添加時の発生成績

EGF添加濃度 (ng/ml)	供試 回数	供試 個数	分割 胚数	分割率 (%)	4cell 期胚数	4cell期胚率 (%)	桑実 胚数	桑実胚率 (%)	6日目		7日目		8日目	
									胚盤 胞数	胚盤胞率 (%)	胚盤 胞数	胚盤胞率 (%)	胚盤 胞数	胚盤胞率 (%)
0	5	100	91	96.8±2.1	88	93.6±3.7	25	26.6±6.4	2	2.1±2.0	13	13.8±5.6	17	18.1±7.3
1	5	100	91	97.8±1.3	86	92.5±3.5	27	29.0±2.7	4	4.3±3.1	24	25.8±8.4	32	34.4±11.1
10	5	100	92	97.9±1.3	88	93.6±4.1	28	29.8±1.3	3	3.2±2.6	20	21.3±2.1	37	39.4±5.8
100	5	100	91	97.8±2.0	86	92.5±5.8	28	30.1±4.6	5	5.4±2.5	21	22.6±5.0	34	36.6±7.3
200	5	100	93	97.9±1.3	92	96.8±1.3	30	31.6±5.9	4	4.2±1.9	19	20.0±5.4	32	33.7±6.6

注1) : mean±SEM

注2) : 同列異符号間に有意差あり(P<0.05)

表2 EGF添加時の細胞数

EGF添加濃度 (ng/ml)	供試 胚数	ICM	TE	合計
0	14	36.5 a,b	65.3	101.8
1	21	39.9 a,b	54.0	93.9
10	22	37.3 a,b	65.0	102.3
100	19	37.2 a	64.1	101.3
200	12	42.7 b	65.8	108.4

注1) : mean±SEM

注2) : 同列異符号間に有意差あり(P<0.05)

表3 IGF-1添加時の発生成績

IGF-1添加濃度 (ng/ml)	供試 回数	供試 個数	分割 胚数	分割率 (%)	4cell 期胚数	4cell期胚率 (%)	桑実 胚数	桑実胚率 (%)	6日目		7日目		8日目	
									胚盤 胞数	胚盤胞率 (%)	胚盤 胞数	胚盤胞率 (%)	胚盤 胞数	胚盤胞率 (%)
0	5	97	88	96.7±1.4	83	91.2±1.8	35	38.5±6.1	2	2.2±1.5	8	8.8±2.9 a	14	15.4±5.7 a,c
2	5	97	87	98.9±1.1	81	92.0±3.9	34	38.6±4.3	2	2.3±2.0	11	12.5±4.8 a,b	11	12.5±4.1 a
10	5	97	89	97.8±1.3	85	93.4±2.5	35	38.5±4.1	4	4.4±1.2	15	16.5±1.9 a,b	21	23.1±3.0 a,d
50	5	98	89	96.7±2.2	85	92.4±3.3	32	34.8±8.0	5	5.4±2.7	19	20.7±4.9 b	32	34.8±6.5 b,d
100	5	98	92	98.9±1.2	89	95.7±1.9	39	41.9±4.5	4	4.3±1.9	19	20.4±1.7 b	27	29.0±6.6 c,d

注1) : mean±SEM

注2) : 同列異符号間に有意差あり(P<0.05)

表4 IGF-1添加時の細胞数

IGF-1添加濃度 (ng/ml)	供試 胚数	ICM	TE	合計
0	2	30.5	61.0	91.5
2	4	37.3	62.3	99.5
10	8	38.3	57.0	95.8
50	8	33.0	65.0	98.0
100	6	41.3	58.8	100.2

注) : mean ± SEM

試験 3：試験 1、試験 2 の結果に基づいて、適正濃度 EGF100ng/ml、IGF- 50ng/ml を PVA-SOF に同時添加し、更にグルコースを 0 ~ 5.6mM 添加した結果、卵割率、4cell 期胚率は、0 添加区と各添加区 (0.2 ~ 5.6mM) の比較において差を認めなかったが、桑実胚率、7、8 日目の胚盤胞発生率において、グルコース濃度が高くなるに従い発生率が低下する影響を認め、またグルコース 1.5mM 添加区は 4.0mM、5.6mM 添加区と比較して有意に高い (P<0.05、P<0.01) 桑実胚率 (37.0 %)、7、8、9 日目の胚盤胞発生率 (7 日目 20.7 %、8 日目 27.2 %、9 日目 28.3 %) を示したことから、媒精後からの PVA-SOF へのグルコースの添加は、添加量が 1.5mM であれば発生率を高めるが、高濃度のグルコースの添加は胚盤胞発生率を低下させる影響があると考え

られた (表 5)。

試験 4：EGF、IGF- を添加した PVA-SOF に、試験 3 の結果から得たグルコース添加濃度を基にして、グルコースの添加量を 1.5mM、4.0mM、添加時期を 0 日目、3 日目、6 日目にしてグルコース添加した結果、卵割率、4cell 期胚率、桑実胚率、6、7 日目の胚盤胞発生率は、各添加区と比較して差を認めなかったが、9 日目の胚盤胞発生率においてグルコースを 6 日目に 4.0mM 添加した区は、43.8 % であり他の添加区と比較して有意に高い (P<0.05) 胚盤胞発生率を示したことから、PVA-SOF へグルコースを 6 日目に 4.0mM 添加は、胚盤胞発生率を高める効果があると考えられた (表 6)。

表5 グルコース添加濃度の違いによる発生成績

グルコース添加濃度 mM	供試 回数	供試 個数	分割 胚数	分割率 (%)	4cell 期胚数	4cell期胚率 (%)	桑実 胚数	桑実胚率 (%)	6日目		7日目		8日目		9日目	
									胚盤 胞数	胚盤胞率 (%)	胚盤 胞数	胚盤胞率 (%)	胚盤 胞数	胚盤胞率 (%)	胚盤 胞数	胚盤胞率 (%)
0.2	6	114	88	92.6±3.3	77	81.8±3.2	35	36.8±5.7 a	1	1.1±1.1	13	13.7±4.0 a,b	15	15.8±4.1 a,b	17	17.9±2.9 a,b,c,d
1.5	6	113	86	93.5±2.0	78	84.8±4.0	34	37.0±5.7 a,c	4	4.3±2.6	19	20.7±3.8 a	25	27.2±3.5 a,A	26	28.3±3.8 b,A
2.0	6	113	92	94.8±2.6	84	86.6±4.3	32	33.0±3.2 a,c	4	4.1±2.9	12	12.4±3.3 a,b	16	16.5±3.7 a,d	16	16.5±3.7 c
4.0	6	113	92	95.8±1.8	84	87.5±1.6	22	22.9±3.1 b,c	1	1.0±1.0	7	7.3±3.7 b,d,e	9	9.4±4.7 b,d,e	11	11.5±4.4 d,c
5.6	6	113	85	91.4±3.7	76	81.7±3.9	15	16.1±3.6 b,c	0	0	0	0.0±0.0 c,e	1	1.1±1.1 c,e,B	1	1.1±1.1 e,B

注1) : mean ± SEM

注2) : 同列異符号間に有意差あり (P<0.05) , A-B (P<0.01)

表6 グルコース添加時期の違いによる発生成績

試験区分	供試 回数	供試 個数	分割 胚数	分割率 (%)	4cell 期胚数	4cell期胚率 (%)	桑実 胚数	桑実胚率 (%)	6日目		7日目		8日目		9日目	
									胚盤 胞数	胚盤胞率 (%)	胚盤 胞数	胚盤胞率 (%)	胚盤 胞数	胚盤胞率 (%)	胚盤 胞数	胚盤胞率 (%)
0	5	93	82	93.2±3.1	73	83.0±8.2	37	42.0±3.1	2	2.3±1.6	13	14.8±4.2	20	22.7±3.6 a,b	21	23.9±3.8 a,b
Day0から1.5mM	5	93	78	92.9±3.8	67	79.8±9.3	35	41.7±4.4	1	1.2±1.2	16	19.0±5.8	21	25.0±3.9 a,b	22	26.2±3.0 a
Day3から1.5mM	5	93	83	96.5±2.4	75	87.2±6.5	40	46.5±4.5	4	4.7±1.2	12	14.0±1.1	18	20.9±3.4 a,b	22	29.3±2.4 a
Day3から4.0mM	5	93	80	95.2±2.5	69	82.1±9.2	33	39.3±6.2	2	2.4±1.5	8	9.5±3.7	12	14.3±4.2 a	13	15.5±4.7 b
Day6から4.0mM	5	93	85	95.5±3.0	74	83.1±7.8	36	40.4±2.9	1	1.1±1.1	18	20.2±3.9	28	31.5±5.2 b	39	43.8±2.3 c

注1) : mean ± SEM

注2) : 同列異符号間に有意差あり (P<0.05)

以上の結果、Sirisathien²³⁾ら、榊原ら²⁴⁾は発生培養液への EGF 添加による胚盤胞発生率の向上は認めなかったと報告しているが、本試験では胚盤胞発生率を高める効果を認めた。また、Sirisathien²³⁾ら、Morera ら²⁵⁾は本試験と同様に、発生培養液への IGF- 添加により胚盤胞発生率の向上を認めており、血清無添加の発生培養液 PVA-SOF への EGF または IGF- を添加することにより、無添加より高い発生率を得ることが確認できた。しかし、EGF、IGF- 添加による細胞数の増加はなく、胚品質の向上効果は認められなかった。

Robl ら²⁶⁾は *in vitro* block 解除以降の胚発生促進にはグルコースが重要であると報告していることから、EGF と IGF- を同時添加した PVA-SOF (グルコース含まない)を用いて、グルコースの添加濃度、添加時期について検討したが、発生培養初期からのグルコース添加は、1.5mM で最も良好な胚盤胞発生率を示したが、高濃度において特に 5.6mM では胚盤胞発生率への悪影響を認めた。Takahashi ら²⁷⁾、Rosenkrans ら²⁸⁾は 5.56mM のグルコース濃度は初期胚の発育を阻害する濃度であると報告していることから、本試験も同様に発生培養初期からグルコースを添加していることが、桑実胚率、胚盤胞発生率を低下させたと考えられる。また、グルコース添加時期の検討において、6 日目にグルコース 4.0mM 添加することによって、9 日目の胚盤胞発生率が 43.8% であり、血清添加の発生培養液の胚盤胞発生率と比較して遜色のない成績を示した。Kim ら²⁹⁾は、5 日目のグルコースの添加は胚盤胞の発育を促進すると報告しており、今回の結果は 5 日目以降の胚においてグルコース利用が高まったことによると考えられた。

以上 5 年間にわたり、優良遺伝子を保有する雌牛から効率的・安定的に双子生産を行うことで、繁殖農家における飼養雌牛の、1 頭当たり子牛生産頭数の増大を図ることを目的として検討¹⁰⁾²⁹⁾³⁰⁾を行った。

しかし、当初から実施していた割球分割操作技術による 1 胚からの双子以上の子牛生産は、胚発生過程において不可能であることが解り、この手法による子牛生産を中止した。その後は、現時点において

優良雌牛の産子を数多く生産できる OPU-IVF の胚生産効率の向上のために発生培養液の検討を行い、EGF と IGF- を同時添加した PVA-SOF に、6 日目からグルコース 4.0mM 添加することによって、血清添加の発生培養液と比較して遜色のない発生成績を得ることができた。今後は、更に高い胚盤胞発生率への向上、生産した体外胚の耐凍性・受胎率の向上を目指して引き続き検討を行いたい。

引用文献

- 1) Shiga, K., et al.
Theriogenology, 52: 527-535, 1999
- 2) Ozil, J. P.
J. Reprod. Fertil, 96: 463-468, 1983
- 3) 志賀一穂
大分畜試報告, 24: 1-14, 1995
- 4) 志賀一穂
西日本畜産学会報, 37: 6-12, 1994
- 5) 志賀一穂
Bio. In, 4: 212-218, 1987
- 6) Willadsen, S. M., et al
Vet. Rec, 10, 240-243, 1984
- 7) Takahahi, M., et al
Biol. Reprod, 66, 562-567, 2002
- 8) McGowan, M. R., et al
Theriogenology, 24: 173-184, 1985
- 9) 鈴木達行
畜産研究, 42: 809-812, 1988
- 10) 梅木英伸・志賀一穂
大分畜試報告, 34: 61-64, 2005
- 11) Michael. R. Roberts., et al
J. Reprd. Dev, 52: 87-97, 2006
- 12) 坂口真一・井口光国・小林直彦ほか
日本胚移植学雑誌, 17: 94-100, 1995
- 13) Kruip. ThAM., et al
Theriogenology, 47: 43-52, 1997
- 14) Behboodi. E., et al
Theriogenology, 44: 227- 232, 1995
- 15) Garry. FB., et al.
Theriogenology, 45: 141- 152, 1996

- 16) Takahashi , S . , et al .
Theriogenology , 37 : 963-978 , 1992
- 17) Mtango . N . R . , et al .
Theriogenology , 59 : 1393-1402 , 2003
- 18) Makarevich . AV and Markkula . M . ,
Biol Reprod , 66 : 386-392 , 2002
- 19) Sirisathien . S and Bracktt . B . G . ,
Mol Reprod Dev , 65 : 51-56 , 2003
- 20) Kim . J . H . , et al .
Theriogenology , 39 : 875-886 , 1993
- 21) 阪谷美樹・小林修司・高橋昌志
九州沖縄農業研究成果情報 , 16 , 2003
- 22) 梅木英伸ほか
第 15 回日本胚移植研究大会講演要旨 , 2008
- 23) Sirisathien . S . , et al .
Anim Reprod Sci , 77 : 21-32 , 2003
- 24) 榊原秀夫・島田浩明・西 康裕
日本胚移植学雑誌 , 21 : 66-74 , 1999
- 25) Moreria . F . , et al
Theriogenology , 57 : 895-907 , 2002
- 26) Robl . JM . , et al
Theriogenology , 35 : Abstract263 , 1991
- 27) Takahashi . First . NL . ,
Theriogenology , 37 : 963-978 , 1992
- 28) Rosenkrans . CF . Jr . , et al
Bio Rorod , 49 : 459-462 , 1993
- 29) 梅木英伸・志賀一穂
大分畜試報告 , 33 : 84-88 , 2004
- 30) 梅木英伸・木下正徳
大分畜試報告 , 35 : 55-58 , 2007